

Aus der II. Inneren Abteilung des
Krankenhauses Berlin-Neukölln
Prof. Dr. med. Irene Boll

WACHSTUMSVERHALTEN VON ZELLEN DES
PERIPHEREN BLUTES BEI PATIENTEN
MIT AKUTEN LEUKÄMIEN IM PHASENKONTRAST

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Christine Spehr
aus Berlin

1983

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der II. Inneren Abteilung des
Krankenhauses Berlin-Neukölln
Prof. Dr. med. Irene Boll

WACHSTUMSVERHALTEN VON ZELLEN DES PERIPHEREN
BLUTES BEI PATIENTEN MIT AKUTEN LEUKÄMIEN
IM PHASENKONTRAST

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Christine Spehr
aus Berlin

Referent: Prof.Dr. I.Boll

Koreferent: Prof.Dr. H. Gerhartz

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 22.7.1983

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. Einleitung und Fragestellung	4
B. Material und Methode	7
1. Sedimentieren der Erythrozyten mit Dextran	7
2. Separation mit Ficoll-Gradienten	7
3. Herstellen einer PHA-P und PWM Verdünnung	8
4. Anfertigung des Supravitalpräparates für die Phasenkontrastkinematographie	8
5. Filmdokumentation	9
6. Auswertung des Films	10
7. Verteilung der einzelnen Leukämietypen bei einem Krankengut von 41 Patienten	13
8. Zytomorphologie im Phasenkontrast	14
a) der normale Blut-Lymphozyt	14
b) der leukämische Myeloblast	14
c) der leukämische Monoblast	15
C. Ergebnisse	17
1. Zellgrößenvergleich leukämischer Blasten mit Lymphozyten von Gesunden zum Zeitpunkt t_0	17
2. Gesonderte Betrachtung von 156 Langzeitdoku- mentationen	24
3. Proliferationskinetik der vergrößerten Zellen	30
4. Die Zellverkleinerungen	40
D. Diskussion	42
E. Zusammenfassung	46
F. Literaturverzeichnis	47
G. Anhang	51
H. Verwendete Abkürzungen	57

A. Einleitung und Fragestellung

Blasten aus dem peripheren Blut von Patienten mit akuten Leukämien sollen mit unspezifischen Mitogenen (PHA-P und PWM) stimuliert werden, um festzustellen, ob Immunblasten aus Lymphozyten oder leukämischen Blasten transformiert werden. Dieser Transformationsvorgang soll mithilfe der phasenkontrastoptischen und -kinematographischen Beobachtung nachgewiesen werden. Den stimulierten leukämischen Blasten wird dabei ein Vergleichskollektiv von

- a) unstimulierten leukämischen Blasten, sowie
- b) stimulierten normalen Lymphozyten gegenüber gestellt.

Durch die planimetrische Messung der Kern- und Zellgrößen, der daraus errechneten Kern-Plasma Relation und die Betrachtung der Morphologie und Kinetik von Veränderungen der leukämischen Blasten im Vergleich mit Immunblasten, soll gegebenenfalls der Beweis für die Umwandlung einer Zellart in die andere geliefert werden.

Die Beobachtung, daß die vielfältigen morphologischen und biochemischen Charakteristika der Mitogen induzierten Immunantwort der T- und B-Lymphozyten in vitro eine Entsprechung zu Antigen induzierten Reaktionen in vivo aufweisen, läßt, neben der quantitativen Bestimmung der T- und B-Zellen, Aussagen über die zelluläre Abwehrlage eines Patienten zu (NOWELL, P.C. 1960, JANOSSY, G. and GREAVES, M.F. 1971, BOLL, I., KÖTTER, R. und AUST, Ch. 1974). Diese Tatsache führte in den letzten Jahren verstärkt dazu, den Einfluß der Antigenstimulation auf Blutleukozyten von leukämischen Erkrankungen zu untersuchen. Es sei dabei betont, daß für die Pathogenese der akuten Leukämien, die Annahme einer Störung der Immunsurveillance überwiegend im Bereich der zellulären Abwehr, nur eines vieler hypothetisch konzipierter Modelle über die Ursachen der malignen Entartung von Zellen ist.

Nach der Auffassung von BOLL, I. und KOEPPEN, K.-M. u.a. handelt es sich pathogenetisch bei den akuten Leukämien um

Ausreifungsstörungen des Stammzellkompartiments. Dies hat die lebensbedrohliche Verminderung der granulo-, mono-, erythro- und thrombopoetischen Proliferationsspeicher zur Folge, da offenbar ein Reifungsblock die Differenzierung der Zellen verhindert hat. Vorerst muß offen bleiben, welche Zellstoffwechselstörung für diesen Proliferationsstop verantwortlich ist.

Experimente von BOLL, I. und KOEPPEN, K.-M. an Blutleukozyten von Patienten mit unbehandelten akuten Leukämien haben in den letzten Jahren wichtige Beiträge zu der Fragestellung geliefert, inwieweit Proliferation und Ausreifung leukämischer Zellen autonom erfolgen, oder aber von stimulierenden Faktoren abhängen (1977 Istanbul, 1978 Buenos Aires). In den von ihnen benutzten in vitro Suspensionskulturen haben die Zellen von unbehandelten Leukämiepatienten ohne Antigenstimulation eine unterschiedliche Fähigkeit zur Proliferation und Reifung gezeigt, die eng an die Prognose gekoppelt ist (1978). Im Vergleich dazu beobachteten sie nach Zugabe von PHA-P und PWM bei 17 von 46 Kulturen eine auffällige Häufung Blasten-ähnlicher Zellen, die im nach PAPPENHEIM gefärbten Ausstrich morphologisch als Immunoblasten identifizierbar waren. Entsprechend hoch war der Immunoblasten-Index bezogen auf die Ausgangs-Lymphozytenzahl, legt man den Mittelwert der Kontrollen von 15 gesunden Patienten zugrunde. Besonders hohe Transformationsraten waren gerade in den Kulturen aufgetreten, deren Zusammensetzung im Ausgang von einem hohen Blastenanteil (30 - 90 %), gegenüber einer niedrigen Anzahl von Lymphozyten gekennzeichnet war. BOLL und KOEPPEN interpretieren diese Ergebnisse als Ausdruck einer Stimulationsfähigkeit leukämischer Zellen und diskutieren, ob neben Lymphozyten auch leukämische Blasten unter Einfluß von PHA-P und PWM die Fähigkeit zur Transformation in Immunoblasten besitzen.

Unterstützt wird dieser Gedankengang auch von anderen Untersuchern. Bei der Auswertung unspezifischer T-Zell-Stimulation bei Blutleukozyten akuter Leukämien fand NEHRING aus

unserem Arbeitskreis (1978) insbesondere in drei Kulturen eine absolut vermehrte Immunoblastenbildung. Diese Blutkulturen stammten von einer zytostatisch vorbehandelten Patientin mit einer AML, sowie von zwei Patienten mit einer AMoL. Auch hier zeigten sich stark erniedrigte Lymphozytenzahlen im Ausgang gegenüber einer großen Anzahl leukämischer Blasten. Für diese und acht weitere Kulturen von Patienten mit AML mit erhöhten Immunoblasten-Indices diskutiert NEHRING die Stimulation leukämischer Blasten zu Immunoblasten. Analog hierzu gestalten sich Ergebnisse von DICKE, K.A., SPITZER, G. und AHEARN, M.J. 1976, SPITZER, G., SCHWARZ, M.A., DICKE, K.M., TRUJILLO, J.M. and McCREDIE, K.B. 1976 an Knochenmarkszellen unbehandelter akuter myeloischer Leukämien. Mithilfe der Agar-Kolonie Technik haben diese Autoren den Einfluß eines PHA-Assay's auf das Wachstumspotential leukämischer Zellen nachweisen können. Ihre Befunde sprechen dafür, daß unter der Einwirkung von PHA aus leukämischen Subpopulationen in vitro determinierte Stammzellen (Colony Forming Cells = CFC's) gebildet werden können.

In Fortführung der aufgeführten Kulturergebnisse soll wegen der Bedeutung für das Verständnis der Pathogenese akuter Leukämien durch fortlaufende Beobachtung von Einzelzellen im Phasenkontrast in dieser Arbeit geklärt werden, ob sich leukämische Blasten zu morphologisch identifizierbaren Immunoblasten transformieren können.

B. Material und Methode

Untersucht wurde durch i.v. Punktion gewonnenes Blut von insgesamt 73 Patienten. Davon waren 41 Patienten an einer akuten Leukämie, bzw. einem Blastenschub bei bekannter CML erkrankt. Ein Vergleichskollektiv von 32 nicht leukämisch erkrankten Patienten wurde demselben experimentellen Versuchsansatz unterzogen.

Bei der Herstellung eines Leukozytenkonzentrates kamen zwei verschiedene Methoden zur Anwendung:

1. Sedimentieren der Erythrozyten mit Dextran

20 ml heparinisiertem Venenblut (10 IU Liquemin/Roche pro ml) werden kurz nach der Entnahme 6 ml Macrodex^R 6% E (Produkt Knoll AG), MG 60.000, zugesetzt. Der erythrozytenfreie Überstand und die 'buffy coat' (Leukozytenschicht über dem Erythrozytensediment) werden nach ca. 1 Std. Aufbewahrung bei Raumtemperatur mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgehebert.

2. Separation mit Ficoll-Gradienten

20 ml einer Ficoll-Lösung, Dichte 1,077 (Seromed) werden mit 20 ml heparinisierter Blutverdünnung (Verhältnis 1 : 1 mit 0,9% NaCl) in einem 55 ml Zentrifugenröhrchen überschichtet. Das Röhrchen wird für 30 Min. bei 1485 g $\pm$ 3000 UPM zentrifugiert. Während der Zentrifugation (Modell Hettich Rotixa/K) bilden sich vier Schichten: die oberste Schicht besteht aus dem verdünnten Plasma, darunter befindet sich ein schmaler Ring mononucleärer Zellen (z.B. Lymphozyten, Monozyten, Leukämiezellen), der einer dritten Schicht, der Ficoll-Lösung aufsitzt. Am Boden des Zentrifugenglases haben sich Erythrozyten und Granulozyten abgesetzt. Das verdünnte Plasma wird entfernt, der Ring mononucleärer Zellen mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgehebert, und die so gewonnenen Zellen einer zweimaligen Waschung unterzogen. Dafür werden die Zellen 1 : 2 mit Hanks'-Lösung (Seromed) verdünnt, bei 950 UPM für jeweils 10 Min. zentrifugiert und dabei von den

Resten der Ficoll-Lösung befreit.

Den nach den oben beschriebenen Verfahren hergestellten Leukozytenkonzentraten wird im späteren Verlauf jeweils 1 Tropfen entnommen, der in die Beobachungskultur eingebracht wird. Dabei wurde den Vitalpräparaten entweder ausschließlich Nährmedium, d.h. RPMI 1640 - Medium (Biocult^R), oder 1 Tropfen einer PHA-P bzw. PWM - Verdünnung beigemischt.

3. Herstellung einer PHA-P bzw. PWM - Verdünnung

1 Tropfen Phythämagglutinin / PHA-P (Difco^R) oder aber Pokeweed-Mitogen-Originallösung (Grand Island Biological Company^R) wird mit RPMI-Medium (Biocult^R) im Verhältnis 1 : 10 verdünnt.

Auf diese Weise konnten in vier phasenkontrastmikroskopischen Einrichtungen Parallelbeobachtungen im stimulierten und unstimulierten Versuchsansatz gleichzeitig und von demselben Patienten durchgeführt werden. Bei den leukämisch erkrankten Patienten wurden in allen Fällen zusätzlich aus dem Leukozytenkonzentrat mit der Zytocentrifuge (Shandon Elliott, Modell SCA 0030, ca. 450 g $\hat{=}$ 1800 UPM) Ausstriche angefertigt, die zur zytologischen und zytochemischen Charakterisierung der Leukämie mit Periodic Acid - Schiff Reagens, α -NA-Esterase, Peroxydase und nach Pappenheim gefärbt wurden.

4. Anfertigung des Supravitalpräparates für die Phasenkontrastkinematographie

Ein Nährkoagulum, bestehend aus 0,3% Agar (Firma Oxoid), Hespuffer und RPMI 1640 - Medium (Biocult^R) soll der Erhaltung der Vitalität der Blutzellen dienen. Das Koagulum wird auf einem rein weißen, alkalifreien Objektträger in verflüssigtem Zustand bei Zimmertemperatur mit einer Pipette sehr flach ausgezogen, an der Luft kurz angetrocknet und in eine Befeuchtungskammer gelegt. Anschliessend werden 1 Tropfen des Leukozytenkonzentrates, sowie 1 Tropfen RPMI 1640 - Medium (Biocult^R) bzw. 1 Tropfen PHA-P oder PWM - Verdünnung gut miteinander vermischt. Hiervon wird dann dem Agar jeweils nur 1 Tropfen aufgesetzt. Ein Deck-

glas der Größe 21 x 26 mm, von 17 μ m Dicke, wird so aufgelegt, daß sich das Gemisch gerade eben bis an dessen Ränder gleichmäßig verteilt. Nur dann liegen die Blutzellen einzeln oder in kleinem Abstand einschichtig nebeneinander und die Flüssigkeitsschicht im Präparat beträgt etwa 3 - 5 μ m. Um die Präparate vor dem Austrocknen zu schützen, werden sie mit einem feinen Pinsel allseitig mit erwärmtem Hartparaffin abgedichtet (BOLL, J. und FUCHS, G. 1961). Die Zeit, die zur Fertigstellung des Präparates und für die Einstellung der Zellen im Phasenkontrastmikroskop benötigt wird, beträgt ca. 3 - 5 Minuten. Vereinend für alle Zellbeobachtungen bezeichnen wir den Beginn der Filmdokumentation als Zeitpunkt t_0 .

5. Filmdokumentation

Zur Betrachtung der in die sog. "platten Beobachungskultur" eingebrachten vitalen Blutzellen stehen vier Phasenkontrastmikroskope zu Verfügung. Jedes dieser Mikroskope ist bis auf das Okular (1 Periplan GF 5 x, 3 Zeiss Winkel 6 x) in einem Wärmeschrank platziert, der automatisch eine Temperatur von 37°C aufrecht erhält, ein Faktor, der eine Angleichung an die in vivo Verhältnisse darstellen und zur längeren Überlebensdauer der Zellen beitragen soll. Zwei Mikroskope der Firma Leitz (Modell Laborlux) und zwei Zeiss Geräte (Modell Opton und Standard WL) sind mit 70- bzw. 100-fachen Ölimmersionsobjekten versehen. Achromatische, aplanatische Hellfeld Phasenkontrast Kondensoren VZ ermöglichen die Betrachtung im positiven Phasenkontrast, wobei sich die Zelle dunkel auf hellem Hintergrund abbildet. Als Lichtquelle dienen Niedervoltleuchten, denen grüne Interferenzfilter vorgeschaltet sind. Die lose Verbindung zwischen Mikroskop und Filmkamera wird über einen Zeiss'schen Grundkörper hergestellt. Die Filmdokumentation erfolgt mit Bolex H 16 Reflex-Aufsatzkameras, die sich in starrer Aufhängung über den Mikroskopen befinden. Sie haben kein Objektiv, aber eine Photozelle, die der Belichtungsmessung dient. Die Kameras sind mit einer Trick- und Zeitrafferereinrichtung (Fa. Kindervater

Berlin-Neukölln) gekoppelt, die die Belichtung automatisch auslöst. Die lebenden Zellen werden in Ölimmersion betrachtet und auf 16 mm Schwarz-Weiß-Negativfilmen (Gevapan 30 neg. 166, AGFA-Gevaert) bei einer Expositionszeit von 0,25 sec in einem Aufnahmeabstand von 10 bis 20 sec dokumentiert. Bei normaler Vorführgeschwindigkeit entsteht so eine Zeitraffung von 240 bis 480-fach. Die Verlaufsbeobachtungen werden zeitlich genau protokolliert und dabei morphologische Zellveränderungen punktuell beschrieben. Eine engmaschige Sichtkontrolle ist erforderlich, um die durch Zellbewegung verursachten Unschärfen zu korrigieren. Zwischen effektiver Filmzeit und gesamter Beobachtungszeit muß differenziert werden, wenn wir einerseits die Zeitraffung, aber darüberhinaus auch die Tatsache, daß die Filmdokumentation zeitweilig unterbrochen werden kann, berücksichtigen. Dem hier untersuchten Zellmaterial liegen Filmzeiten von mindestens 1 Stunde und maximale Beobachtungszeiten von 6 Tagen zugrunde.

6. Auswertung des Films

Die 16 mm Negativfilme werden in Positivfilme umcopiert und mit dem HKS-Filmbetrachter ausgewertet. Dieser wirft auf einen Bildschirm in definiertem Abstand ein lineares Bild des 16 mm Positivs, das dabei 10-fach vergrößert wird. Der Einzelbildzähler (Fa. Hünemörder Eßlingen) erlaubt die genaue zeitliche Rekonstruktion im Falle besonderer morphologischer Zellveränderungen. Mit dem von Hand betriebenen Filmbetrachter lassen sich Lauf- und Teilbildanalysen anstellen, deren Vorteil darin besteht, zellspezifische Kriterien (z.B. Motilität, Wachstum, Mitosen, degenerative Veränderungen) komplex zu erfassen (GEBAUER 1978). Vor den Bildschirm wird ein Papier gespannt. Die Scharfeinstellung erfolgt am Anfang der Betrachtung. Gezeichnet werden im Beobachtungsverlauf sich scharf abbildende Zellkonturen (Kernmembran, Zellumrisse, Einkerbungen, Zytoplasmaausspülungen, intrazelluläre Granula u.a.) mindestens 3 x, gegebenenfalls mehrfach.

Im Phasenkontrast muß berücksichtigt werden, daß eine exakte Wiedergabe zwischen Zellgrenze und umgebendem flüssigen Milieu nicht möglich ist. Geringe Phasenunterschiede werden als Amplitudendifferenzen dem Auge nur sichtbar durch das Auftreten eines Lichthofs (Halo), der folglich jede Zelle umgibt. Dabei variiert seine Breite in Abhängigkeit von der Form der Zelle. Der Halo ist um so schmaler, je flacher sich die Zelle in der planparallelen Kammer austreckt und nimmt an Breite zu, je mehr die Zelle dazu übergeht sich abzurunden (z.B. beim Eintritt in die Mitose). In jedem Fall liegt die wirkliche Zellgrenze innerhalb des Lichthofs (RIND, H. 1963). Vereinbarungsgemäß wird der innere Rand des Halo als Zellgrenze bei der zeichnerischen Übertragung aufgefaßt, wodurch ein konstanter Fehler in die Zellflächenmessung mit eingeht. Diese Ungenauigkeit entfällt bei der zeichnerischen Abbildung des Kerns, dessen Kontur sich für den Betrachter scharf durch die Kernmembran von der Umgebung abhebt.

Für die in dieser Arbeit untersuchten Zellen wurden folgende Parameter ermittelt: Zellgröße - Kerngröße - Kern/Plasma-Flächen-Relation - Kern/Plasma/Durchmesser-Relation - Kernklasse nach JACOBJ.

Die Flächenmessungen wurden mit einem Planimeter (Haff N^o317 Seriennummer 253 75) vorgenommen; dabei wurde jede Zelle dreimal vermessen, ein Mittelwert errechnet, um die Messungengenauigkeit möglichst gering zu halten. Diese Werte müssen mit dem für jedes Mikroskop spezifischen Vergrößerungsmaßstab, der sich aus Objektiv- und Okularvergrößerung und dem Abstand Okular-Filmebene ergibt, multipliziert werden, der den tatsächlichen Flächenwert der Zellen bzw. der Kerne in μm^2 ausdrückt.

Der Kerndurchmesser ergibt sich aus der Formel:

$$\sqrt{\text{Fläche} \times 4 : \pi} = x \text{ in } \mu\text{m}.$$

Aus diesem Wert läßt sich für jede einzelne Zelle in Anlehnung an LEIBETSEDER die Kernklassenzugehörigkeit bestimmen.

Tabelle 1

Kerndurchmesser (μm)	Kernklasse / LEIBETSEDER
bis 5	1/16
5 - 6	1/8
6 - 7,3	1/4
7,3 - 9,3	1/2
9,3 - 11,6	1
11,6 - 14,5	2
über 14,5	4

7. Verteilung der einzelnen Leukämietypen bei unserem Krankengut von 41 Patienten

Die systematische Zusammenfassung der für die Versuche verwendeten 41 akut leukämisch erkrankten Patienten gestaltete sich nach zytologischen und zytochemischen Befunden (LÖFFLER, H. 1969 + 1975 und PAULISCH, R. 1975) folgendermaßen:

Akute myeloische Leukämie (AML)	22 Patienten	(53,7 %)
Blastenschub b. chron.myeloischer L.	5 "	(12,2 %)
Akute monozytäre Leukämie (AMoL)	8 "	(19,5 %)
'Smouldering Leukemia'	4 "	(9,8 %)
Akute lymphatische Leukämie (ALL)	1 "	(2,4 %)
Akute Promyelozytenleukämie (AProL)	1 "	(2,4 %)

Die Untersuchungen der Blutzellen wurden mit Ausnahme der an einer CML erkrankten Patienten jeweils vor Therapiebeginn vorgenommen. Im Mittelpunkt des Interesses für die Verlaufsbeobachtungen standen zwei Zelltypen:

- a) Lymphozyten von Gesunden
- b) Leukämische Blasten

8. Zytomorphologie im Phasenkontrast

Die morphologischen Kriterien zur Differenzierung im Phasenkontrast sehen nach BESSIS, BOLL, RIND und STOBBE für beide Zellarten folgende Merkmale vor:

a) Der Blut-Lymphozyt

Der kleine Lymphozyt stellt sich als polymorphe, schwach granulierte Zelle dar. Der relativ große Kern ist in seiner Form rund bis oval, oder bohnen- bzw. hörnchenförmig gestaltet und grenzt sich durch seine Kernmembran scharf vom umgebenden Zytoplasma ab. Seine Chromatinstruktur ist vorwiegend phasenpositiv. Das Zytoplasma verbreitert sich im Bereich der Kernbucht, in der zahlreiche Mitochondrien als runde, stäbchen- oder kommaförmige, grau bis schwarze Granula liegen.

Stimulierte Lymphozyten sind größer im Kern und besonders im Zytoplasma und unterscheiden sich hinsichtlich ihres Kernchromatins, das von blasser, weniger dichter eher streifig bis fleckiger Natur ist und in ihren groben, schwarzen Zytoplasmagranula. Gelegentlich heben sich ein oder mehrere Nukleolen scharf als phasenpositive Gebilde ab.

Das Bewegungsverhalten der Lymphozyten am Ort und in Lokomotion wurde von RIND 1958 beschrieben und in die Typen I - III unterteilt. Nach Bewegungsstudien von BOLL 1971, BOLL und NITZEL 1972, GEBAUER 1978 und früheren Beobachtungen anderer Autoren darf der Typ III, die sogenannte Handspiegelform in seiner Eigenschaft als Lymphozyten-spezifisches und damit differenzierendes Charakteristikum angesehen werden. Daneben sind "Peripolese und Emperipolese" bisher noch für keine andere Zellart beschrieben.

b) Der leukämische Myeloblast

Im Phasenkontrast stellt sich der leukämische Myeloblast in runder Form mit regelmäßiger Zellbegrenzung dar. Die Kernmembran umspannt einen ca. 4/5 der Zelle einnehmenden Kern und grenzt sich zum schmalen Zytoplasmasaum hin scharf ab.

Die Gestalt des Zellkerns ist nicht ganz rund, gelegentlich sogar gelappt oder nierenförmig. Im phasennegativen Chromatin heben sich 1-3 dunkle Nukleoli neben fläckigen, phasenpositiven Strukturen ab. Im Zytoplasma schwimmen gelegentlich einzelne Stäbchen oder Granula (Mitochondrien).

RIND legte für leukämische Blasten die Bewegungstypen I - III fest. Leukämische Myeloblasten gehören zum Teil zum Typ III, der die Merkmale einer zielgerichteten Fortbewegung aufweist. Dabei vollzieht der Myeloblast symmetrische Kontraktionen, die von starken Zellkern- und Granulabewegungen begleitet werden. Dem frontalen Zellpol sitzt eine undulierende Membran auf. Der Bewegungsablauf wird als wurmartig beschrieben. Der Uropode fehlt.

Während die alleinige Betrachtung der Zellgröße zu Fehldifferenzierungen mit den Lymphozyten im Ruhestadium führen kann, ist die Unterscheidung beider Zellarten im Stadium der Fortbewegung eindeutig möglich:

c) Der leukämische Monoblast

Die leukämischen monozytären Zellen weisen charakteristisch geformte, ziemlich bizarre Zellkerne mit zahlreichen Abschnürungen und Lappenbildungen auf, gleichen aber in ihrer Kernstruktur dem Myeloblasten. Auch sind im Zytoplasma meist mehrere kleine, dunkle Granula diffus verteilt. Das Zytoplasma neigt zur Blisterbildung. Für leukämische Monoblasten gelten demnach annähernd dieselben Kriterien, wie für die nicht leukämischen. Eine eindeutige Zuordnung der Zelle ist durch ihre Größe gegeben (SOMMER, K.-M. 1976; Tab. 2).

BOLL und NITZEL 1972 beschreiben für viele leukämische Monoblasten ein Bewegungsverhalten, das dem yp III entspricht und von lebhaften Zellkernverformungen und reger Pseudopodienbildung an diversen Stellen der Zirkumferenz begleitet wird. In ihrer Fortbewegung kennzeichnet sie ein Zickzackkurs.

Zu b) und c) siehe auch BOLL, I. 1974.

Tabelle 2

Mittlere Flächen der Zellen und Kerne, errechnete Durchmesser und Kern/Zytoplasma-Relationen von Blut-Lymphozyten und Blasten aus gesundem Knochenmark (BOLL 1980) und leukämischen Blasten aus dem peripheren Blut (eigene):

n	Kernflächen (μ^2_x)		$\bar{x}$	Zellflächen (μ^2_x)		$\bar{x}$	KernØ (μ_x)		σ	ZellØ (μ_m)		σ	KPØ-R	
	σ	$\bar{x}$		σ	$\bar{x}$		σ	$\bar{x}$		σ	$\bar{x}$			
Blut-Lym-														
phozyten														
Boll:	26	27,03 ± 7,99	52,80 ± 12,14	0,51 ± 0,08	5,80 ± 0,87	8,14 ± 0,97	0,71 ± 0,060							
eigene:	72	30,38 ± 12,41	61,83 ± 27,63	0,51 ± 0,09	6,14 ± 1,16	8,68 ± 1,83	0,71 ± 0,061							
Myelo-														
blasten														
Boll:	108	46,25 ± 14,83	80,14 ± 25,29	0,58 ± 0,10	7,58 ± 1,19	10,09 ± 1,73	0,75 ± 0,075							
eigene:	128	46,68 ± 18,08	92,14 ± 45,59	0,54 ± 0,13	7,49 ± 1,11	10,48 ± 2,42	0,72 ± 0,092							
Mono-														
blasten														
Boll:	79	73,88 ± 26,84	132,63 ± 42,73	0,55 ± 0,09	9,56 ± 1,69	12,84 ± 2,04	0,74 ± 0,059							
eigene:	25	52,12 ± 22,41	105,94 ± 45,76	0,51 ± 0,09	8,18 ± 1,80	11,81 ± 2,26	0,71 ± 0,060							

C. Ergebnisse

1. Zellgrößenvergleich leukämischer Blasten mit Lymphozyten von Gesunden zum Zeitpunkt t_0

Von 73 Patienten wurden insgesamt 225 Zellen beobachtet und ausgewertet. Die nachstehende Tabelle 3 a - c erfasst das untersuchte Material unter dem Aspekt der Größenverteilung zum Beobachtungsbeginn (Zeitpunkt t_0) systematisch. Die Zellen wurden entsprechend ihrem ermittelten Kerndurchmesser, den Kernklassen 1/16 - 2 nach LEIBETSEDER zugeordnet. Pro Kernklasse sind jeweils die absoluten Zellzahlen bzw. deren prozentualer Anteil bezogen auf die Gesamtzahl (n) der beobachteten Zellen angegeben. Im Fall der leukämischen Blasten wird numerisch eine Aufteilung nach den verschiedenen Leukämietypen vorgenommen. Unter Zusatz von PHA + PWM werden Lymphozyten von Gesunden mit leukämischen Blasten, und wiederum beide Zellarten mit leukämischen Blasten ohne Mitogenzusatz verglichen. Dazu veranschaulicht die Abb. 1 die Größenverteilung der drei Zellgruppen zum Zeitpunkt t_0 . Die prozentualen Werte wurden der Tabelle 3 a - c entnommen und gegen die auf der Abzisse abgebildeten Kernklassen aufgeführt.

Tabelle 3 a - c

a) Lymphozyten von Gesunden zum Zeitpunkt t_0 unter Zusatz von PHA + PWM

Patientengut	32	Kernklassen/LEIBETSEDER zum Zeitpunkt t_0					
		1/16	1/8	1/4	1/2	1	2
Gesamtzahl (n)							
beobachtete Zellen: 72		11	28	24	9	0	0
Prozentualer Anteil:		15,3	38,9	33,3	12,5	-	-

b) Leukämische Blasten zum Zeitpunkt t_0 unter Zusatz von PHA + PWM

Patientengut	23	Kernklassen/LEIBETSEDER zum Zeitpunkt t_0					
		1/16	1/8	1/4	1/2	1	2
AML	65	4	8	11	38	3	1
AMoL	8	1	1		5	1	
Smould. L.	6		3		1	2	
ALL	2				2		
CML	17	1	3	5	7	1	
Gesamtzahl (n) beob.Zellen:	98	6	15	16	53	7	1
Prozentualer Anteil		6,2	15,3	16,3	54	7,2	1

c) Leukämische Blasten zum Zeitpunkt t_0 ohne Mitogenzusatz

Patientengut	21	Kernklassen/LEIBETSEDER zum Zeitpunkt t_0					
		1/16	1/8	1/4	1/2	1	2
AML	32	2	4	9	12	5	
AMoL	9		1	3	5		
Smould. L.	5			1	1	2	1
APro.L.	5		1	4			
CML	4			1	3		
Gesamtzahl (n) beob.Zellen:	55	2	6	18	21	7	1
Prozentualer Anteil:		3,7	10,9	32,7	38,2	12,7	1,8

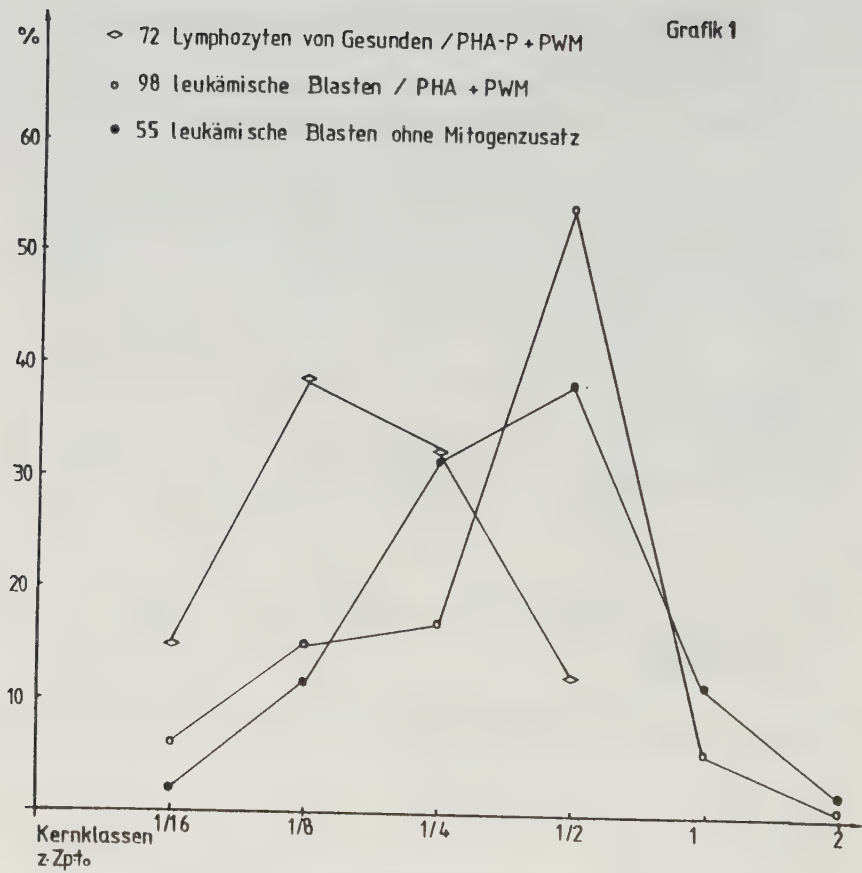


Abb. 1. Prozentuale Verteilung der untersuchten Zellarten auf die Kernklassen zum Beobachtungsbeginn (Zeitpunkt t_0)

Von den 72 Lymphozyten gehören monophasisch maximal 38,9 % der Klasse $1/8$ bzw. 33,3 % der Klasse $1/4$ an; ihre Zuordnung beschränkt sich auf die Klassen $1/16 - 1/2$. In diesem Bereich kommt es zu einer Überschneidung mit den leukämischen Blasten, deren Kurven eine Streuung über die gesamte Verteilungsbreite, einschließlich der Klasse 2 zeigen. Dieser Verlauf bestätigt bisherige Untersuchungen von BOLL (1972 und 1976), die deutliche Größenschwankungen leukämischer Myeloblasten beschreiben. Besonders im peripheren Blut leukämisch erkrankter Patienten treten nach KILLMANN 1968 und GAVOSTO 1964 gelegentlich Microblasten auf. Diese Beobachtung bestätigen wir! Bei 98 leukämischen Blasten, denen zum Beobachtungsbeginn PHA-P und PWM zugesetzt wurde, markiert sich deutlich ein Schwerpunkt mit 54 % in der Klasse $1/2$. Die 55 leukämischen Blasten ohne Mitogenzusatz verhalten sich hinsichtlich der Verteilungsbreite und dem Maximum von 38,2 % in der Kernklasse $1/2$ sehr ähnlich. Dagegen sind mit einem Anteil von 32,7 % Zellen in der Klasse $1/4$ deutlich stärker vertreten.

Eine andere Möglichkeit, die Verteilung der Größenverhältnisse von Lymphozyten Gesunder und leukämischen Blasten zu veranschaulichen, ist die Projektion der planimetrisch ermittelten Flächenwerte von Zelle und Kern in Form von Streupunktkurven (Abb. 2. + 3.). Von 72 normalen Lymphozyten werden die Kernflächen (μm^2) gegen die auf der Ordinate aufgeführten Zellflächenwerte zum Beobachtungsbeginn (Zeitpunkt t_0) aufgetragen. Die Abbildung der 153 leukämischen Blasten erfolgt in eben derselben Weise.

Grafik 2

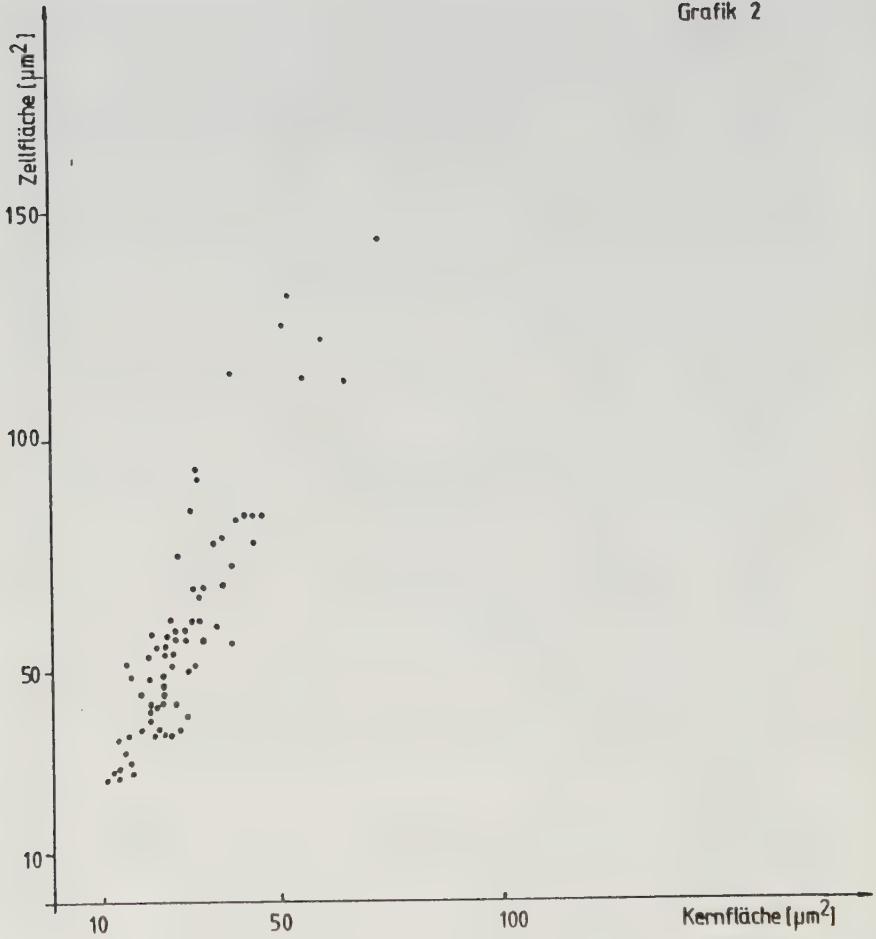


Abb. 2. Relation der Kern- zu den Zellenflächen von 72 Lymphozyten zum Zeitpunkt t_0 unter Zusatz von PHA-P und PWM

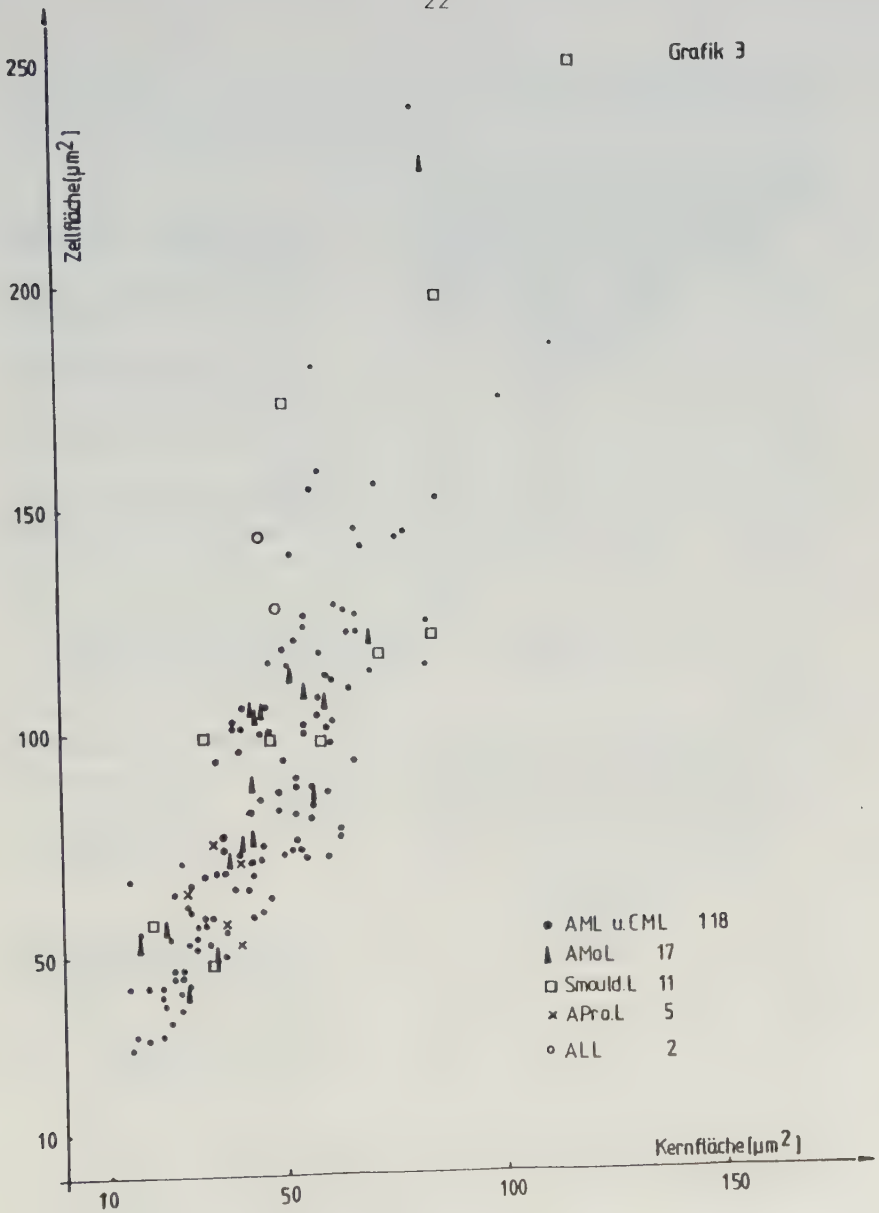


Abb. 3. Relation der Kern- zu den Zellflächen von 153 leukämischen Blasten zum Zeitpunkt t_0

Grafik 4

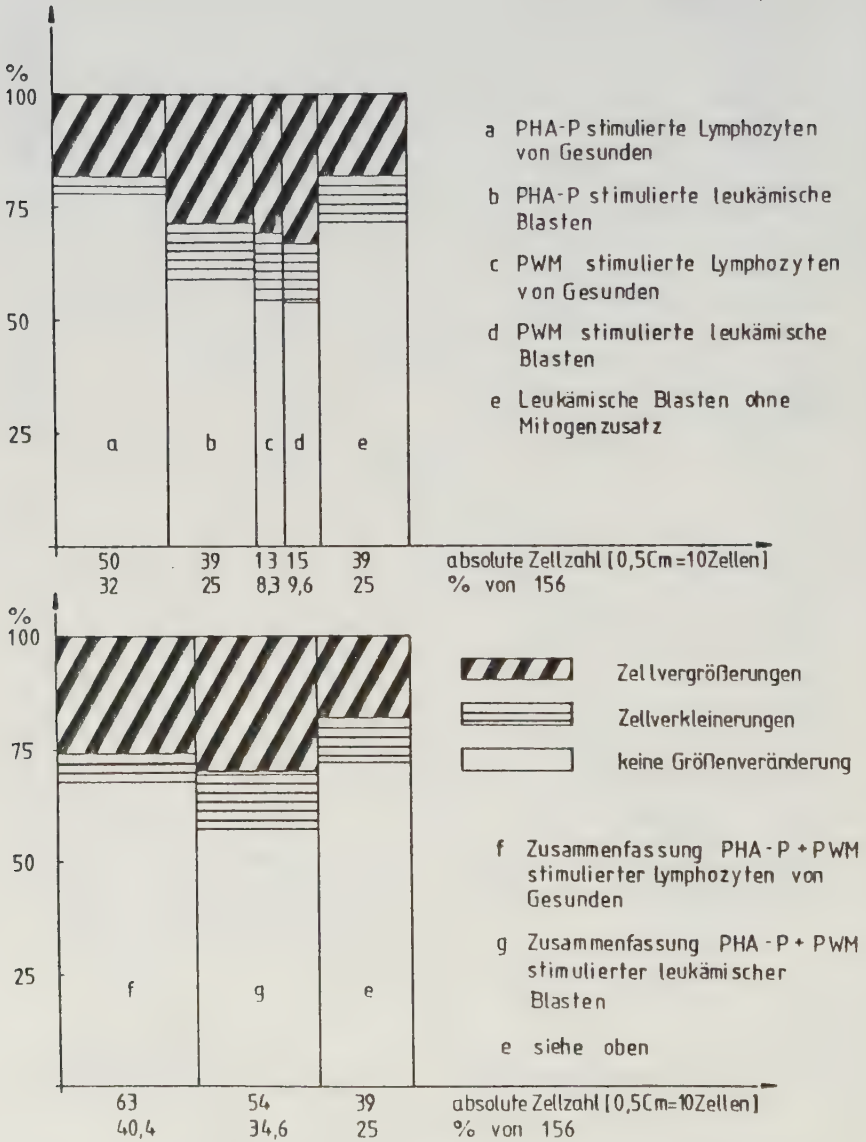


Abb. 4. Größenverteilungsmuster von 156 Verlaufsbeobachtungen (> 4 Std. FZ.) grafisch aufgetragen nach absolutem und prozentualem Zellanteil

2. Gesonderte Betrachtung von 156 Langzeitdokumentationen

Von 225 Gesamtbeobachtungen wurden 156 Verläufe mit einer Filmzeit von über 4 Stunden dokumentiert. Wir gehen davon aus, daß wirkliche Zellveränderungen, speziell Größenänderungen, die hier besondere Betrachtung finden sollen, nur im längeren Verlauf eine reale Bedeutung haben. Als Vergrößerungen werteten wir ausschließlich Zunahmen der Kernflächen bzw. -durchmesser, worüber mindestens ein Aufrücken in die nächst höhere Kernklasse (siehe Tab. 1, S. 12) festzustellen war. Analog trafen wir die Zuordnung für die Zellverkleinerungen.

Einen zusammenfassenden Überblick über das Größenverteilungsmuster der Zellen in der Dauerbeobachtung gibt die Abb. 4. Nebeneinander, in säulenförmiger Anordnung, sind auf der Abszisse die absoluten Zellzahlen der Vergleichsgruppen a - e aufgetragen. Gleichzeitig ist ihr prozentualer Anteil im Hinblick auf die Gesamtzahl von 156 dokumentierten Verläufen an dieser Stelle erwähnt. Das Maß der Massen-Veränderung der Zellen (Vergrößerung - Verkleinerung - $\emptyset$ Änderung) drücken die auf der Ordinate befindlichen Prozentangaben aus. Die zugrunde liegenden Zahlen wurden der Tabelle 4 a - g entnommen.

In der Abb. 4. sind Vergrößerungen und Verkleinerungen zeichnerisch markiert, übereinander vom Teil der nicht veränderten Zellen abgesetzt. Aussagekraft kommt wiederum dem Vergleich beider Zellarten, sowie den verwendeten Mitogenen zu, weshalb ihre Anordnung paarweise in den Gruppen a - d erfolgt ist. Die Säule e verkörpert die unstimulierten leukämischen Blasten; in f und g werden Blasten und Lymphozyten nochmals, jedoch zusammengefaßt als "gesamt-stimulierte" Zellen nebeneinander zum Vergleich mit den unstimulierten leukämischen Blasten aufgeführt.

Tabelle 4 a - g

a) PHA stimulierte Lymphozyten von Gesunden

Patientengut		Dokumentat. > 4 Std.FZ			
		Vergröß.		Verklein. ØÄnder.	
Gesamtzahl (n)					
beob.Zellen:	59	50	9	2	39
Prozentualer Anteil:			18	4	78

b) PHA stimulierte leukämische Blasten

		Dokumentat.			
Patientengut	20	> 4 Std.FZ	Vergröß.	Verklein.	Änder.
AML	51	29	9	3	17
AMoL	5	0	0	0	0
Smould.L.	6	3	1	1	1
CML	12	7	1	1	5
Gesamtzahl (n)					
beob.Zellen:	74	39	11	5	23
Prozentualer Anteil:			28,2	12,8	59

c) PWM stimulierte Lymphozyten von Gesunden

Patientengut		Dokumentat. > 4 Std.FZ Vergröß. Verklein. Änder.			
Gesamtzahl (n)					
beob.Zellen:	13	13	4	2	7
Prozentualer Anteil:			30,8	15,4	53,8

d) PWM stimulierte leukämische Blasten

Patientengut	7	Dokumentat. > 4 Std.FZ			
		Vergröß.	Verklein.	Änder.	
AML	14	8	3	0	5
AMoL	3	2	1	1	0
ALL	2	0	0	0	0
CML	5	5	1	1	3
Gesamtzahl (n)					
beob.Zellen:	24	15	5	2	8
Prozentualer Anteil:			33,3	13,3	53,3

e) Leukämische Blasten ohne Mitogenzusatz

Patientengut	21	Dokumentat. > 4 Std.FZ			
		Vergröß.	Verklein.	Änder.	
AML	32	24	2	6	19
AMoL	9	8	1	1	3
Smould.L.	5	3	2	0	1
APro.L.	5	0	0	0	0
CML	4	4	2	0	2
Gesamtzahl (n)					
beob.Zellen:	55	39	7	4	28
Prozentualer Anteil:			18	10,2	71,8

f) Zusammenfassung PHA + PWM stimulierter Lymphozyten von Gesunden

Patientengut	32	Dokumentat. > 4 Std.FZ			
		Vergröß.	Verklein.	Änder.	
Gesamtzahl (n)					
beob.Zellen:	72	63	13	4	46
Prozentualer Anteil:			20,6	6,4	73

g) Zusammenfassung PHA + PWM stimulierter leukämischer
Blasten

		Dokumentat. > 4 Std.FZ			
Patientengut	23	Vergröß.	Verklein.	Änder.	
AML	65	37	12	3	22
AMoL	8	2	1	1	0
Smould.L.	6	3	1	1	1
ALL	2	0	0	0	0
CML	17	12	2	2	8
Gesamtzahl (n) beob.Zellen:	98	54	16	7	32
Prozentualer Anteil:			29,6	13	57,4

Aus der Abbildung 4 geht hervor, daß in allen Versuchsreihen der Anteil der Zellen, der keine Größenänderung erfahren hat, über 50 % beträgt. Bemerkenswert erscheint andererseits, daß sich Veränderungen (Vergrößerungen und Verkleinerungen) im Fall der leukämischen Blasten auch spontan vollzogen, wenn auch insgesamt nur zu 28,2 %. Der Zusatz von Mitogenen zu Blastenkulturen hatte quantitativ einen wesentlich höheren Prozentsatz, nämlich bei PHA-P 41 % und PWM 46,6 % von Größenänderungen zur Folge, und ist als Zeichen der Stimulationsfähigkeit dieser Zellen zu bewerten. Bei den gleichstarken Gruppen b und e äußert sich diese insbesondere bei den Zellvergrößerungen, wobei die stimulierten leukämischen Blasten mit 29,6 % die unstimulierten mit nur 18 % deutlich übertreffen. Eine Signifikanz läßt sich jedoch weder für diese Differenz, noch im Hinblick auf das verwendete Mitogen nachweisen.

Über das Ausmaß der Stimulationsempfindlichkeit läßt der Vergleich beider Zellarten Aussagen zu, da sie denselben Versuchsbedingungen unterlagen. Insbesondere in der paarweisen Betrachtung der Versuchsreihen wird deutlich, daß die größere Empfindlichkeit hier offenbar die leukämischen Blasten auszeichnet.

Unter PHA-P Stimulation verändern sich leukämische Blasten in der Gruppe b zu 41 % gegenüber 22 % Lymphozyten nicht hämatogen Erkrankter der Gruppe a. In den als "gesamt-stimuliert" benannten Gruppen f und g liegen die Blasten mit 42,6 % eindeutig höher als die Gruppe der Lymphozyten mit 27 % bei annähernd gleichem Untersuchungsgut (n). Eine Ausnahme machen nur die PWM stimulierten Blasten und Lymphozyten, deren Verteilungsmuster bei miteinander gut vergleichbaren Zahlenpaaren nahezu identisch verläuft. Ob diese Beobachtung als Ausdruck einer gesteigerten Stimulationsempfindlichkeit der Lymphozyten für PWM zu bewerten ist, kann bei der niedrigen Zahl der Beobachtungsverläufe hiermit noch nicht endgültig beurteilt werden. Für das von uns ermittelte Ergebnis zeigt die statistische Prüfung keine Signifikanz. Einheitlich kennzeichnet darüberhinaus alle Versuchsreihen, daß mindestens doppelt so viele Zellen eine Größenzunahme als -abnahme erfahren.

Die Tabelle 5 a - c faßt die Daten von 156 Verlaufsbeobachtungen mit einer Filmzeit von mindestens 4 Stunden (mediane Beobachtungszeit: 29,5 Std.) zusammen. Für die drei Versuchsanordnungen ist die differenzierte Verteilung der Zellen über die Klassen 1/16 - 2 zum Beobachtungsbeginn t_0 nach absoluten und prozentualen Angaben erfolgt, wobei die leukämischen Blasten ihrem Leukämietyp entsprechend zugeordnet sind. Daneben werden alle Zellen gesondert betrachtet, die während des Beobachtungsverlaufs $t_0 - t_x$ eine Veränderung im Sinne einer Vergrößerung oder Verkleinerung erfahren haben. Für diese beiden Gruppen wurde ergänzend ihre prozentuale Verteilung zum Beobachtungsende t_x hinzugefügt, um die Verlaufsveränderung innerhalb der Kernklassen zu verdeutlichen. Zusätzlich hervorgehoben sei als zweiter morphologischer Parameter die Kern/Plasma/Durchmesser-Relation; ihre Zunahme (+), Abnahme (-), bzw. ein gleichbleibendes Verteilungsverhältnis (=) wird ebenfalls in absoluten und prozentualen Werten, bezogen auf die Gesamtzahl (n) der vergrößerten und verkleinerten Zellen angegeben.

Tabelle 5 a - c

Kernklassen / LEIBETSEDER		sämtlicher Zellen:				der Vergrößerungen:				KPa-R / t ₀ - t _x der vergrößerten Zellen:				der Verkleinerungen:				KPa-R / t ₀ - t _x der verkleinerten Zellen:			
zum Zpht.	t ₀ + t _x	$\frac{1}{16}$	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{2}$	1	$\frac{1}{16}$	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{2}$	1	$\frac{1}{16}$	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{2}$	1	$\frac{1}{16}$	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{2}$	1
a. PHA-P + PWM stimulierte Lymphozyten																					
ε: 63		9	24	21	9	0	0														
prozentual/t ₀		14,3	38,1	33,3	14,3	-															
prozentual/t _x																					
b. PHA-P + PWM stimulierte leukämische Blästen																					
AML 37		2	2	6	24	2	1														
AMol 2		0	0	0	2	0	0														
Smoul L 3		0	1	0	0	2	0														
CML 12		0	2	4	6	0	0														
ε: 54		2	5	10	32	4	1														
prozentual/t ₀		37	9,3	18,5	59,3	7,4	1,8														
prozentual/t _x																					
c. Unstimulierte leukämische Blästen																					
AML 24		2	3	7	9	3	0														
AMol 8		0	1	3	4	0	0														
Smoul L 3		0	0	1	1	0	1														
CML 4		0	0	1	3	0	0														
ε: 39		2	4	12	17	3	1														
prozentual/t ₀		5,1	10,3	50,7	43,6	7,7	2,3														
prozentual/t _x																					

(+) erhöht

(-) erniedrigt

(=) unverändert

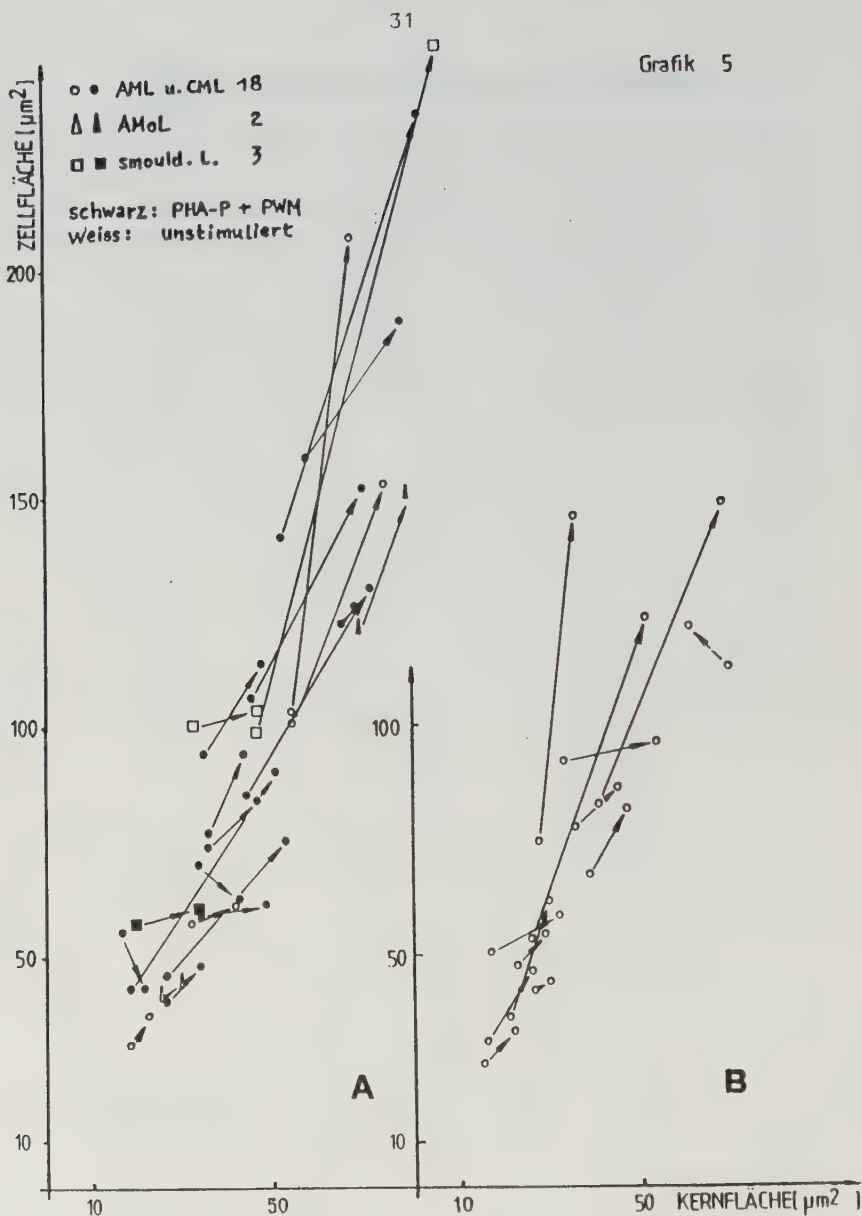
Gesonderte Betrachtung der Verlaufsbeobachtungen

3. Proliferationskinetik der vergrößerten Zellen

Von den stimulierten Lymphozyten vergrößerten sich insgesamt $n = 13$ (20,6%) Zellen; wovon $n = 2$ unter Stimulation mit PHA-P morphologische und kinetische Veränderungen vollzogen, die sie als Immunblasten charakterisieren ließen (siehe Abb. 5./Tab. 5 a, Spalte 2). Ihre Umwandlung erfolgte innerhalb einer Beobachtungsdauer von 33 und 49 Stunden, wobei ein Unterschied in der vorausgegangenen Einflußnahme des Mitogens von 24 und 72 Stunden bei beiden Zellen berücksichtigt werden muß (Anh. III). Ein Lymphozyt vergrößerte sich unter der Stimulation von $1/8$ nach $1/2$ (Nr. 2), der andere veränderte seine Kernklasse von $1/8$ nach $1/4$ (Nr. 9). Noch drei weitere PHA-P stimulierte Lymphozyten zeichneten sich durch Vergrößerungen um 2 Kernklassen aus. Davon konnten zwei, ursprünglich der Klasse $1/4$ zugehörig, später der Klasse 1 zugeordnet werden (Nr. 7 + 8), der dritte vergrößerte sich von $1/16$ auf $1/4$ (Nr. 4). Bei zweien veränderte sich die Kern/Plasma-Relation nicht, bei dem dritten Lymphozyten nahm sie zu. In der Gesamtwertung zeigte die $KP\phi$ -Relation eine Zunahme von 0,03.

Insgesamt haben sich $n = 16$ (30%) der PHA-P oder PWM stimulierten leukämischen Blasten während einer medianen Beobachtungsdauer von 33 Stunden in RPMI-Medium vergrößert (siehe S. 31, Abb. 5./Tab. 5 b, Spalte 2 + 3/Anhang I). Davon haben $n = 9$ (56,2%) ihre Vergrößerung überwiegend durch Kernwachstum vollzogen ($KP\phi$ -Relation $\bar{x} : + 0,10$). Zu diesen gehören auch die bereits erwähnten 2 Blasten einer AML, die sich durch 'Mehrklassenvergrößerung' auszeichneten (Anhang I/ Nr. 5 + 6); $n = 7$ (42,4%) der Zellen wuchsen durch gleichmäßige Zunahme von Kern und Zytoplasma ($KP\phi$ -Relation $\bar{x} : + 0,01$).

In keinem Fall haben wir eine Ausreifung der Zelle zum Pro-myelozyten oder Promonozyten beobachtet. Die gewachsenen Zel-



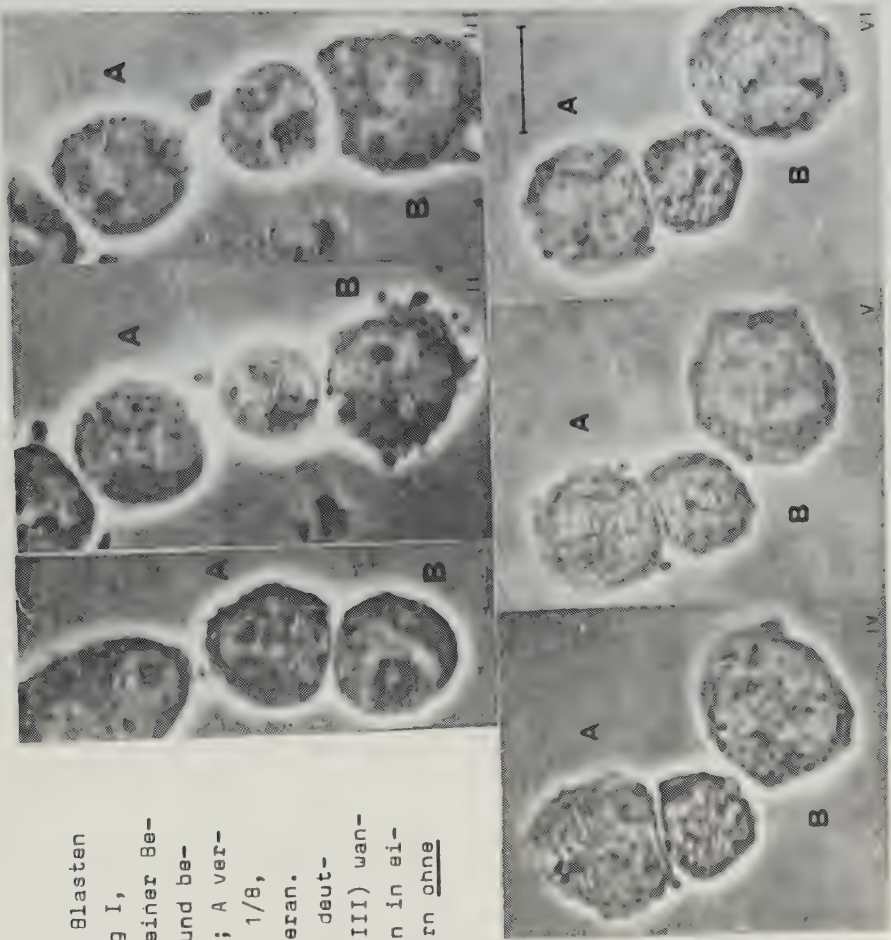
- A. Veränderungen der Kern/Plasmaflächen von 23 sich vergrößernden leukämischen Blasten im Verlauf $t_0 - t_x$
- B. Veränderungen der Kern/Plasmaflächen von 13 sich vergrößernden Lymphozyten unter Stimulation (PHA-P + PWM) im Beobachtungsverlauf $t_0 - t_x$

Abb. 6.

Zwei kleine PLWM stimulierte Blasten (A + B) aus AML-Blut (Anhang I, Nr. 3 + 4) wachsen während einer Beobachtung von 69,5 Stunden und bekommen 1 bzw. 2 Glanzkörner; A vergrößert sich von K $1/16$ auf $1/8$, B wächst von K $1/4$ zu $1/2$ heran. Der phasennegative Kern mit deutlichen Nukleolen (Teilbild III) wandelt sich bei beiden Blasten in einen stark strukturierten Kern ohne Nukleolen um.

— 10 μ m.

(Teilbild I-III/1. Tag;
Teilbild IV-VI/2. Tag)



len entwickelten häufig mehr Zytoplasmaorganellen, aber Mitosen traten keine auf (hierzu Abb. 6, S. 32).

Anders stellt sich das Wachstum der unstimulierten leukämischen Blasten dar. Hiervon sind $n = 7$ (18%) während einer medianen Beobachtungszeit von 26 Stunden in RPMI-Medium gewachsen; $n = 2$ (28,5%) Zellen zeigten KPØ-Relation Zunahmen von $\bar{x} : + 0,09$, ebensoviele aber auch ein gleichmäßiges Wachstum von Kern und Zytoplasma. Bemerkenswert erscheinen 3 weitere Blasten (Tab. 5 c, Spalte 4/Anhang II, Nr. 5 + 7), von denen 2 einer CML, 1 Blast einer smould.L. angehören. Ihre Kerne vergrößerten sich von $K \frac{1}{2}$ auf 1; aber viel stärker wuchsen die Zellen, so daß das Kern/Plasma-Verhältnis sank (KPØ-Rel. $\bar{x} : - 0,12$)! Wir haben hier dreimalig die Reifung vom Monoblasten zum Promonozyten dokumentieren können, ein Vorgang, der neben dem Wachstum der Zellen auch eine Zunahme von Zytoplasmaorganellen beinhaltete. Den Blasten aus CML-Blut lagen dabei annähernd gleiche Beobachtungszeiten zugrunde (24 und 27 Stunden), der dritte Blast wurde weit länger, nämlich 69 Stunden beobachtet. Mitosen traten auch hier nicht auf (hierzu Abb. 7, S. 34).

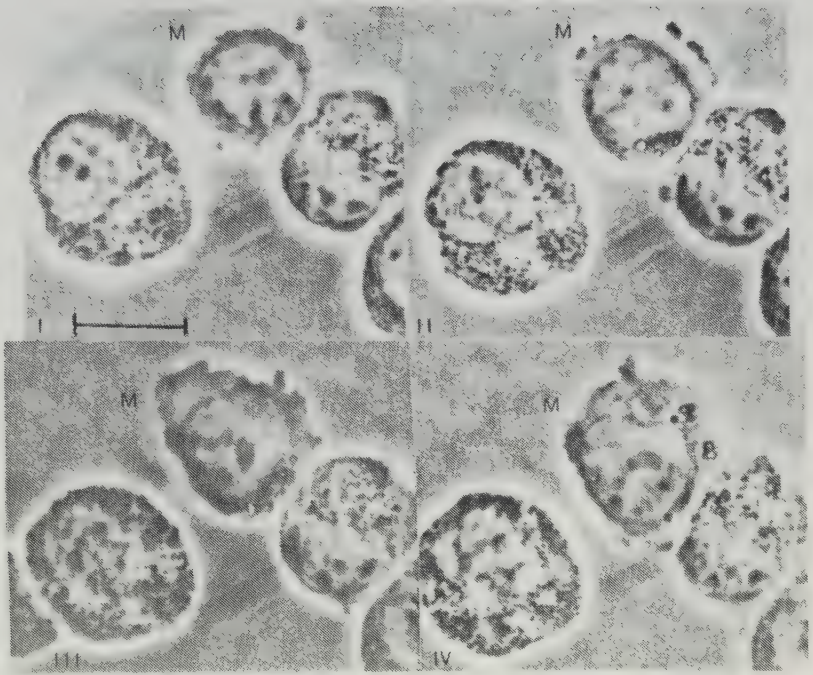


Abb. 7. Ein Monoblast aus CML-Blut reift zwischen 2 Granuloblasten innerhalb von 24 Stunden zum Promonozyten. Vergrößerung von K $1/2$ auf 1 (Anhang II, Nr. 6); im Zytoplasma haben sich Glanzkörper gebildet. Hier bleibt die Kernstruktur mit Nukleolen erhalten.

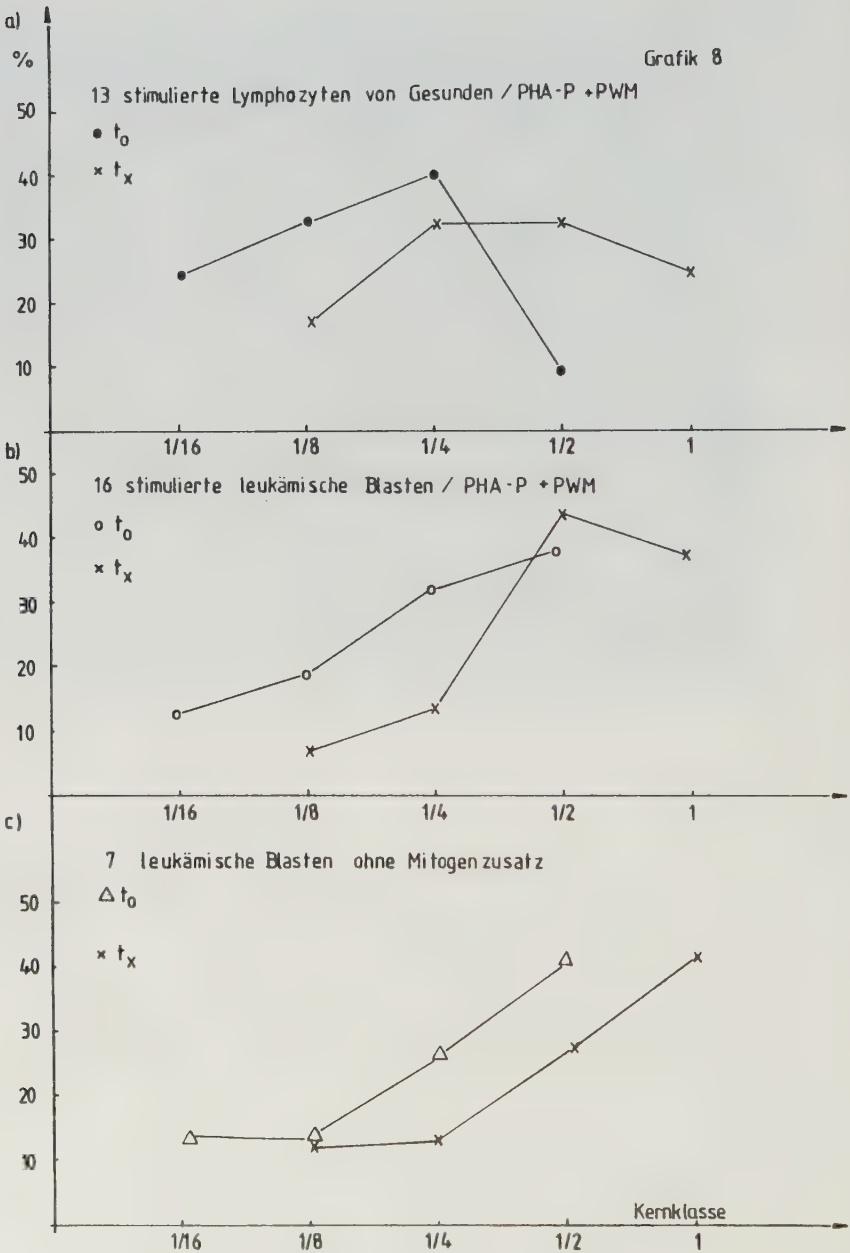


Abb. 8.

Die Abb. 8. veranschaulicht das Wachstum der drei genannten Gruppen unter dem Aspekt der Kernklassenverschiebung im Beobachtungsverlauf $t_0 - t_x$ (mediane Zeit t_x : stimulierte Lymphozyten 26,3 Std., stimulierte leukämische Blasten 33 Std., unstimulierte leukämische Blasten 26 Std.). Die Kernklassen sind auf der Abszisse gegen den prozentualen Anteil der Zellen auf der Ordinate aufgetragen. Die Zahlen sind der Tab. 5 a - c entnommen. Ausdruck des Wachstums ist in den drei Vergleichsgruppen eine Rechtsverschiebung des Kurvenverlaufs. Wegen der oben beschriebenen Vergrößerungen einzelner Zellen um mehrere Kernklassen zeigen stimulierte leukämische Blasten und Lymphozyten keine Veränderung im Sinne einer parallelen Rechtsverschiebung. Die Blasten überschreiten zum Zeitpunkt t_x mit 43,7% den zu t_0 vertretenen Zellanteil von 37,5% in der Kernklasse 1/2. Bei den stimulierten Lymphozyten ist dadurch besonders ein Anstieg der Zellen in der Klasse 1/2 von anfänglich 7,6% auf 30,8% erfolgt. Der Gruppenvergleich zeigt, daß alle Zellen, auch die unstimulierten leukämischen Blasten, Vergrößerungen bis zur Klasse 1 erzielen. Hier liegt der Anteil der unstimulierten Blasten sogar mit 42,8% am höchsten, noch über dem der stimulierten Blasten mit 37,5%. Selbst 23% der stimulierten normalen Lymphozyten erreichen diese Größe!

Die Abb. 9. gibt als Streupunktkurve die Relation der Kernflächen zu den Zellflächen von 153 leukämischen Blasten wieder; im Gegensatz zur Abb. 3., S. 22 ist das Verteilungsverhältnis zum Beobachtungsende, Zeitpunkt t_x (im Mittel: 13,7 Std.) abgebildet.

Der Vergleich beider Abb. 3 und 9 zeigt im Prinzip eine identische Verteilung der Streupunkte.

Grafik 9

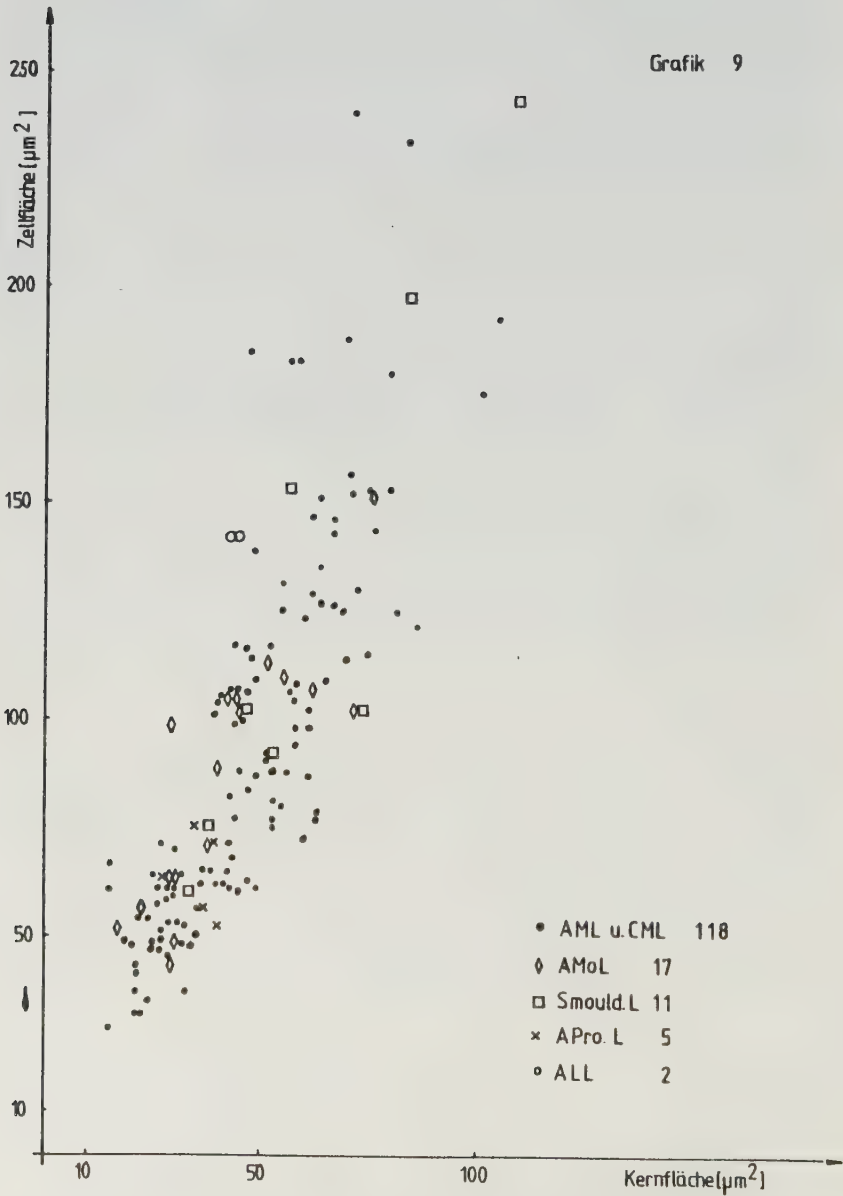


Abb. 9. Relation der Kernflächen zu den Zellflächen von 153 leukämischen Blasten zum Zeitpunkt t_x

In der Tabelle 6 (S. 39) sind die Zeitangaben über die Dauer der Verlaufsbeobachtung und ihrer Dokumentation für die leukämischen Blasten erfaßt. Die Einrichtung des Einzelbildzählers ermöglicht bei der Filmauswertung die exakte Bestimmung des Zeitpunktes, zu dem sich wesentliche morphologische Veränderungen vollzogen haben. Es werden im einzelnen die vergrößerten leukämischen Blasten betrachtet, deren Unterteilung in zwei Gruppen in Abhängigkeit von der Stimulation vorgenommen ist. Für die Lymphozyten von Gesunden ist allein der errechnete Mittelwert angeführt, weil einzelne Zellen schon vor Beginn der Filmdokumentation 24 bzw. 48 Stunden unter Mitogenstimulation standen. In der Tab. 6. ist neben den Zeiten die Änderung der Kernklasse über den Verlauf, als auch der Zeitpunkt angegeben, zu dem die entscheidende Vergrößerung stattgefunden hat. Es ergeben sich folgende Werte:

a) für 13 stimulierte Lymphozyten von Gesunden

5,26 $\pm$ 3,69 Std.

b) für 16 stimulierte leukämische Blasten

6,0 $\pm$ 3,57 Std.

c) für 7 unstimulierte leukämische Blasten

6,16 $\pm$ 3,23 Std.

Dieses Ergebnis zeigt für die leukämischen Blasten keine Unterschiede, das heißt, die Zeitdauer der Kernvergrößerung ist unabhängig von der Stimulation. Der Vergleich mit den Lymphozyten weist auf eine nur geringfügige Differenz der Stimulationsdauer bei beiden Zellarten hin.

Tabelle 6 a+b

Zeitliche Zuordnung der Vergrößerungen bei Verlaufsbeobachtungen
an leukämischen Blasten

a. 16 leukämische Blasten nach Stimulation mit PHA-P u. PWM

Leukämietyp	Beobachtungszeit	Filmzeit	KK-Änderung von bis	Eintritt d. Ver- größerung nach t:
AML	69 h,35'	20 h,36'	1/16 - 1/8	4 h,45'
Smould.L	7 h,10'	6 h,43'	1/8 - 1/4	6 h,32'
AML	22 h,35'	7 h,20'	1/2 - 1	6 h,40'
CML	4 h,55'	4 h,55'	1/2 - 1	4 h,32'
AMoL	28 h,15'	9 h,30'	1/2 - 1	3 h,39'
AML	89 h,30'	32 h,16'	1/2 - 1	0 h,34'
CML	48 h,35'	11 h,56'	1/2 - 1	11 h,44'
AML	4 h,00'	4 h,00'	1/4 - 1/2	2 h,32'
AML	25 h,32'	9 h,23'	1/8 - 1/2	7 h,10'
AML	25 h,32'	9 h,23'	1/16 - 1/2	7 h,10'
AML	69 h,35'	20 h,36'	1/4 - 1/2	4 h,45'
AML	29 h,00'	13 h,50'	1/2 - 1	13 h,38'
AML	25 h,30'	12 h,47'	1/4 - 1/2	6 h,10'
AML	25 h,30'	12 h,47'	1/8 - 1/4	6 h,10'
AML	25 h,30'	12 h,47'	1/4 - 1/2	6 h,10'
AML	25 h,30'	12 h,47'	1/4 - 1/2	6 h,10'

b. 7 leukämische Blasten ohne Stimulation mit PHA-P u. PWM

AML	6 h,45'	6 h,45'	1/16 - 1/8	1 h,23'
AMoL	25 h,28'	8 h,53'	1/16 - 1/8	2 h,40'
CML	27 h,45'	14 h,08'	1/2 - 1	6 h,20'
CML	24 h,50'	7 h,15'	1/2 - 1	5 h,02'
Smould.L	69 h,52'	15 h,20'	1/2 - 1	7 h,36'
Smould.L	23 h,20'	14 h,40'	1/4 - 1/2	12 h,20'
AML	7 h,00'	7 h,00'	1/4 - 1/2	6 h,35'

4. Die Zellverkleinerungen

Nach denselben Gesichtspunkten folgt nun die Betrachtung und Interpretation der stattgefundenen Zellverkleinerungen. Wie bereits erwähnt ist hierbei von besonderem Interesse, eine wirkliche Verkleinerung von degenerativen Verlaufsveränderungen zu differenzieren. Die zumeist sehr langen Beobachtungszeiten von durchschnittlich 25 Stunden beinhalteten für beide Zellarten sowohl solche als jene Erscheinungen.

Bei 2 von insgesamt 15 Zellen beobachteten wir eine Verkleinerung um 2 Kernklassen, sämtliche anderen Zellen verringerten ihre Größe um eine Klasse. Bei den um 2 Kernklassen verkleinerten Zellen handelte es sich um stimulierte leukämische Blasten, wovon einer der CML zugehörig war und seinen Kern von $1/4$ auf $1/16$, der andere, Blast einer AML, seine Größe von $K\ 1/2$ auf $K\ 1/8$ verminderte.

Welche Verschiebungen sich darüberhinaus innerhalb der Kernklassen im Verlauf nach t_x ergaben, ist im einzelnen der Tabelle 5 a - c zu entnehmen.

Veränderungen der $KP\emptyset$ -Relation äußerten sich für sämtliche Zellverkleinerungen entweder in einer Abnahme oder gleichmäßigen Größenminderung von Kern und Zytoplasma. Letztere kennzeichnete insbesondere stimulierte leukämische Blasten, wohingegen der Überwiegende Teil der Zellen in den beiden anderen Gruppen seine Verkleinerung hauptsächlich mit dem Kern vollzog. Im einzelnen machten wir folgende Beobachtungen:

Insgesamt verkleinerten sich $n = 4$ stimulierte Lymphozyten, davon degenerierte 1 nach 20 Stunden, wobei der Kernverkleinerung auch Zytoplasmaabschnürungen vorausgegangen waren. Die drei anderen Lymphozyten behielten bis zuletzt (t_x : 35 Std.) ihre Vitalität; ihre $KP\emptyset$ -Relation nahm über die Beobachtungszeit hin ab, darüberhinaus zeigten sie keine weiteren morphologischen Auffälligkeiten.

Von $n = 7$ stimulierten leukämischen Blasten waren alle bis zum Ende der Dokumentation (t_x : 26,5 Std.) sehr vital; $n = 3$ (2/AML - 1/AMoL) zeigten dabei rege Zellbewegungen vom

Typ III nach RIND, sowie intermittierend starke Zellkontraktionen am Ort. In diesen drei Fällen ist daher anzunehmen, daß wir mit unseren Messungen keine Verkleinerungen im eigentlichen Sinne, sondern eine reversible Zustandsänderung der Zelle im Sinne einer Abkugelung erfaßt haben. Bei 1 Blasten einer AML gingen mit der Verkleinerung von $K \frac{1}{2}$ auf $K \frac{1}{4}$ deutlich morphologische Veränderungen der Kernstruktur einher, die wir als Prae-Prophase interpretierten. Diese Dokumentation bezog sich auf einen Zeitraum von 5 Std. 30 Min.. Einmalig, bei einer smould.L., beobachteten wir unter PHA-P eine Ausreifung vom Promonozyten zum Monozyten; für diese Differenzierung, die unter gleichmäßiger Abnahme von Kern- und Zytoplasmagröße erfolgte, benötigte die Zelle 10 Stunden.

2 Blasten einer CML, die beide zum Beobachtungsbeginn der Klasse $\frac{1}{4}$ zuzuordnen waren, verkleinerten sich nach $K \frac{1}{16}$ und $K \frac{1}{8}$. Beide Zellen waren dabei bis zum Zeitpunkt t_x (27 und 48 Stunden) uneingeschränkt vital, jedoch vollzogen sich weiter keine morphologischen Veränderungen, die eine Deutung dieses Vorgangs ermöglichten.

2 unstimulierte leukämische Blasten einer AML zeigten ebensolche ungeklärten Verkleinerungen nach 9 und 11 Stunden der Beobachtung; bei 2 anderen (AML / AMoL) führten wir die Veränderungen auf Degeneration zurück (t_x : 4 und 11 Stunden).

Es ergeben sich folgende mittlere Werte für den Zeitpunkt der Kernklassenänderung, abzüglich der beobachteten Prae-Prophase, der Zellabkugelungen und Degenerationen:

- a) für 3 stimulierte Lymphozyten von Gesunden
 $10,91 \pm 4,16$ Std.
- b) für 3 stimulierte leukämische Blasten
 $8,33 \pm 1,45$ Std.
- c) für 2 unstimulierte leukämische Blasten
 $10,00 \pm 1,41$ Std.

D. Diskussion

Ergebnisse von Differentialzählungen an Pappenheim gefärbten Kulturausstrichen (BOLL, I. 1977/79 und KOEPPEN, K.-M. 1978) weisen auf die Fähigkeit von leukämischen Blasten zur Transformation in Immunoblasten unter der Stimulation mit PHA-P bzw. PWM hin: Dies sollte an Einzelzellen im Phasenkontrast beobachtet werden.

Für diese Untersuchung standen 153 leukämische Blasten des peripheren Blutes von 41 akut leukämisch erkrankten, noch unbehandelten Patienten zur Verfügung. Davon wurden 98 Zellen mit Mitogenen stimuliert, die restlichen 55 Zellen erhielten keinen Zusatz stimulierender Faktoren. Der Kontrolle dienten 72 Lymphozyten, die aus dem peripheren Blut nicht hämatologisch erkrankter Patienten gewonnen waren; und sämtlich unter Einfluß von PHA-P bzw. PWM standen.

Uns interessierte die Frage, inwieweit Proliferation, Differenzierung, und möglicherweise Transformation leukämischer Zellen nachweisbar ist, von stimulierenden Faktoren abhängt, oder sogar spontan erfolgen kann. Gegenüber derzeit üblicher in vitro Untersuchungsverfahren, wie der Agar-Kolonie Technik, 1966 von BRADLEY, T.R. und METCALF, D., sowie ICHIKAWA, Y., PLUZNIK, D.H. & SACHS, L. entwickelt, der Diffusionskammermethode von ØYUM 1972 oder aber der Suspensionskulturen, wie sie BOLL, I., KURRLE, E. und HOELZER, D., oder MOORE, M.A.S. et al. seit Jahren angewendet werden, wählten wir für unser methodisches Vorgehen die Phasenkontrastkinematographie, da der Nachweis der direkten Umwandlung leukämischer Blasten nur morphologisch und nicht funktionell oder mit Markern möglich ist.

Maßgeblich für unsere Untersuchung waren die von NITZEL, H. 1976 und GEBAUER, H.J. 1978 herausgearbeiteten morphologischen Charakteristika für leukämische Blasten und Immunoblasten, und der Vergleich mit den von BOLL, I. 1973 und 1980 mikrokineamatographisch belegten Reifungen leukämischer und nicht leukämischer Blasten zu Promyelozyten und Promono-

zyten.

In dieser Arbeit wurden insgesamt 225 Zellbeobachtungen, davon 156 Langzeitbeobachtungen mit einer effektiven Filmzeit von 4 - 90 Stunden/Zelle ausgewertet. Zell- und Kerngrößen wurden über die Beobachtungszeit planimetrisch ermittelt. Ihre Klassifizierung nach den von LEIBETSEDER, F. 1957 und JACOB, W. 1925 benannten karyometrischen Regeln ermöglichte eine bessere Übersichtlichkeit der Ergebnisse. Auf diese Weise erhielten wir für jede der Zellgruppen Kernklassenverteilungsprofile, die miteinander verglichen werden konnten. Den zellspezifischen Reaktionen, insbesondere der Änderung der Kern/Plasma-Relation auf die Stimulation mit PHA-P und PWM, galt im Hinblick auf die an Stichproben gewonnenen Feststellungen von BOLL und KOEPPEN unser besonderes Interesse.

So konnten wir, unabhängig vom Leukämietyp, bei 30% der leukämischen Blasten in RPMI-Medium nach Zusatz der genannten Mitogene ein Wachstum bei einer mittleren Beobachtungszeit von 33 Stunden feststellen, wobei sich die KP-R entweder nicht veränderte, oder aber zunahm.

Häufig bildeten sich auch grobe, helle Granula im Zytoplasma der gewachsenen Zellen, jedoch war ihre Ausreifung in Zellen der Proliferationsspeicher morphologisch nicht zu sichern. Nur 1 Blast einer CML verringerte unter PHA-P seine KP-R und differenzierte, allerdings unter Verkleinerung, in die monopoetische Reihe. Keiner der stimulierten leukämischen Blasten erfüllte die von GEBAUER geforderten Kriterien, die die Transformation zum Immunblasten annehmen ließ. Diese beobachteten wir ausschließlich bei 2 Lymphozyten der Kontrollgruppe, denen PHA-P zugesetzt war. Von den unstimulierten leukämischen Blasten wuchsen im RPMI-Medium nur 18% der Zellen während einer medianen Beobachtungszeit von 26 Stunden. Auch hier blieb die KP-R entweder konstant, oder sie nahm zu; bei 3 Monoblasten, die zu Promonozyten ausreiften, verringerte sich die KP-R. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den von BOLL 1973 dokumentierten Spontanreifungen leukämischer Knochenmarks-

zellen.

Untersuchungen an $n = 364$ Einzelzellen aus nicht hämatogen erkranktem Knochenmark (BOLL, 1980) zeigten unter Zusatz von 40 - 90% autologem Serum bei 13% der beobachteten Zellen Reifungen, während 12%, hiervon allerdings alle im Medium mit 90% autologem Serum, innerhalb 4 - 40stündiger Beobachtungszeit auf Stammzellebene weiterwuchsen.

Demzufolge haben wir mit unseren Beobachtungen an leukämischen Blasten aus dem peripheren Blut ein offensichtlich stärkeres und schnelleres Wachstum der Zellen, obgleich nur im RPMI-Medium, insbesondere unter Mitogenzusatz nachgewiesen. Die stärkere Wachstumsstimulation von 30% führen wir auf den Einfluß der Mitogene zurück. Unter PHA-P traten sogar vereinzelt bei Blasten und Lymphozyten Vergrößerungen um mehrere Kernklassen auf. Signifikante Unterschiede der Proliferation im Hinblick auf die Verwendung von PHA-P oder PWM konnten wir für leukämische Blasten, entsprechend der Arbeit von NEHRING, nicht feststellen. Mit unseren Ergebnissen bestätigen wir Untersuchungen von DICKE, K.A., SPITZER, G. & AHEARN, M.J. 1976 an PHA stimulierten leukämischen Knochenmarkszellen.

Außerdem können wir aber auch für unstimulierte leukämische Blasten des peripheren Blutes ein Wachstumspotential nachweisen.

Die Frage, ob leukämische Blasten zu Immunoblasten transformieren können, müssen wir weiter offen lassen; diesbezüglich soll jedoch noch folgende Überlegung angeführt werden.

Wir haben für die 153 leukämischen Zellen erhebliche Größenunterschiede, unabhängig vom Mitogenzusatz, beobachten können. Sie verteilten sich über sämtliche Kernklassen, mit einem Maximum bei K 1/2. Zu Überschneidungen von Mikroblasten (KILLMANN, S.-A. 1968 und GAVOSTO, F. et al. 1964) und Lymphozyten kam es insbesondere bei K 1/8 und K 1/4. In diesem Bereich ist für den Betrachter des fixierten Präparates die Möglichkeit zu Fehldeutungen gege-

ben. Dies ist bei unserer Methode wesentlich vermindert, da neben der Morphe zelltypische Bewegungsabläufe die Differenzierung mitbestimmen. Dieser Aspekt macht die Hypothese der Blastentransformation nochmals Überdenkenswert. NEHRING fand besonders hohe absolute Immunoblastenindices in den Suspensionskulturen akuter Leukämien, die sich durch niedrige Lymphozyten-Ausgangszahlen hervortaten. Nach unseren Phasenkontrastbeobachtungen sollte in Betracht gezogen werden, ob bei NEHRING nicht Lymphozyten als Mikroblasten morphologisch identifiziert wurden. Zellverkleinerungen traten im Übrigen kurz vor dem Zelltod oder als reversible Zustandsänderung der Zelle auf und war bei 1 stimulierten Blast einer smould. L. mit der Reifung zum Monoblasten verbunden.

E. Zusammenfassung

Wir haben 225 mikrokinetographische Beobachtungen an Einzelzellen akut leukämisch erkrankter Patienten und Lymphozyten von Gesunden über eine Zeit von 4 - 90 Stunden mit und ohne Verwendung von Mitogenen (PHA-P und PWM) in RPMI-Medium angestellt und nach morphologischen Kriterien ausgewertet. Das Blut war von 73 Patienten durch Venenpunktion gewonnen. Die Diagnosen (AML, AMoL, smould. L., Blastenschub bei CML) der bis zum Zeitpunkt unserer Untersuchungen noch unbehandelten Leukämien waren zytomorphologisch und zytochemisch gesichert. Durch planimetrische Messungen der Zell- und Kerngrößen erhielten wir Kernklassenverteilungsprofile, die die morphologischen Verlaufsänderungen objektivieren und vergleichen ließen. Wir stellten fest, daß die Stimulierbarkeit leukämischer Blasten durch die Mitogene PHA-P und PWM, zwar nicht signifikant, so doch häufiger vorkommt (30% der Beobachtungen), als bei Lymphozyten nicht hämatogen erkrankter (20% der Beobachtungen). Leukämische Blasten wuchsen unter Wahrung ihres Kern-Plasma Verhältnisses und entwickelten vielfach Plasmaorganellen.

Diese Feststellung hebt sich deutlich von Ergebnissen der unstimulierten leukämischen Blasten mit 18% der Beobachtungen und Untersuchungen an Einzelzellen aus gesundem Knochenmark von 12% Vergrößerungen auf Stammzellebene ab.

Zu spontanen Reifungen in unstimulierten Blutkulturen kam es bei 3 Monoblasten (2 CML/1 smould.L.); Größenzunahme einhergehend mit Abnahme der Kern/Plasma-Relation kennzeichnete sie, neben typischer Kinetik, am Ende der Beobachtung als Promonozyten. Im übrigen blieb die Kern/Plasma-Relation der gewachsenen Zellen entweder konstant, oder aber nahm zu. Reifung mit Verkleinerung vom Promonozyten zum Monozyten trat einmalig unter Stimulation mit PHA-P bei einer smould.L. auf. Von den normalen Lymphozyten transformierten 2 zu Immunoblasten. Mitosen traten in unserem gesamten Untersuchungsmaterial nicht auf.

F. Literaturverzeichnis

- ABBREDERIS, K., SCHMALZL, F. und BRAUNSTEINER, H. (1977) Zytologie der akuten Leukosen - Grenzen der morphologischen Diagnostik. Lab. med. 1 : 106.
- BESSIS, M. (1973) Living Blood Cells and their Ultrastructure. Springer-Verlag. Berlin - Heidelberg - New-York.
- BOLL, I. und FUCHS, G. (1961) Vereinfachtes Verfahren zur kurzfristigen Kultivierung von menschlichem Knochenmark in vitro. Blut 7, 257.
- BOLL, I. (1971) Der Lymphozyt - Struktur, Physiologie, Pathologie und Klinik -. 1. Tagungsbericht der österreichischen Gesellschaft für Hämatologie, Wien, 387.
- BOLL, I. (1971) Bewegungsstudien an nicht stimulierten und stimulierten Lymphocyten sowie Retothelsarkomzellen. Verhandlungsbericht der 2. Arbeitstagung über Leukocytenkulturen, Essen 1970; Hrsg. G. Brittinger, H.J. Regenbach. F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart - New York, 19.
- BOLL, I. (1972) Einführung in den Gesprächskreis "Proliferationskinetik der Leukämien". Leukämie, Editores; Hrsg. R. Gross, J. van de Loo. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 161.
- BOLL, I. und NITZEL, H. (1972) Die Kinetik leukämischer Blasten (Myeloblasten, Monoblasten, Lymphoblasten) im Vergleich mit Mononucleosezellen (Bewegungsstudien im Zeitrafferfilm). Hrsg. R. Gross, J. van de Loo - Leukämie - Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 199.
- BOLL, I. (1973) Morphologische phasenkontrast-kinematographische Studien zum Verhalten von Knochenmarkzellen in vitro. Blut XXVII, 159.
- BOLL, I. (1974) Phasenkontrastmorphologie und Kinetik der granulocyto- und monopoetischen Stammzelle. Dtsch. Haemat. Kongr. Wien 1974 c.
- BOLL, I., KÖTTER, R. und AUST, Ch. (1974) Die Phythaemagglutinininkultur als Test zur Verlaufskontrolle lymphoproliferativer Erkrankungen. Dtsch. med. Wschr. 99, 678.

- BOLL, I. (1976) Morphologische phasenkontrast-kinematographische Studien zum Verhalten von Knochenmarkszellen in vitro. X. Myeloblasten und Monoblasten. Blut 32, 115.
- BOLL, I. (1977) Zellkinetik der Haemoblastosen. Lab.med. 1 : 8.
- BOLL, I., KOEPPEN, K.-M. unter techn. Assistenz v. DOMEYER, C. (1979) Beurteilung der zellulären Immunität maligner Lymphome durch morphologische Auswertung von Antigen-stimulierten Blutkulturen. Lymphoknotentumoren. Hrsg. Alois Stacher und Paul Höcker. Urban & Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore, 127.
- BOLL, I. (1980) Die morphologische Charakterisierung des myelopoetischen Stammzellspeichers beim Menschen. Folia Haematol., Leipzig 107/4, 531.
- BØYUM, A., BOECKER, W., CARSTEN, A.L., CRONKITE, E.P. (1972a) Proliferation of human bone marrow cells in diffusion chambers implanted into normal or irradiated hosts. Blood 40, 163.
- BRADLEY, T.R. & METCALF, D. (1966) The Growth of Mouse Bone Marrow Cells in vitro. Aust. J. exp. Biol. med. Sci. 44, 287.
- DICKE, K.A., SPITZER, G., AHEARN, M.J. (1976) Colony Formation in vitro by Leukaemic Cells in Acute Myelogenous Leukemia with Phytohaemagglutinin as Stimulating Factor. Nature 259, 129.
- GAVOSTO, F., PILERI, A., BACHI, C., PEGORARO, L. (1964) Proliferation and maturation defect in acute leukaemia cells. Nature 203, 92.
- GEBAUER, H.J. (1978) Geschwindigkeit und Größe der Lymphozyten im Phasenkontrastzeitrafferfilm. Dissertation, Berlin.
- ICHIKAWA, Y., PLUZNIK, D.H. & SACHS, L. (1966) In vitro Control of the Development of Macrophage and Granulocyte Colonies. Proc. natn. Acad. Sci., 56, 488.
- JACOB, W. (1925) Über das rhythmische Wachstum der Zellen durch Verdoppelung ihres Volumens. Wilhelm Roux' Arch. Entwickl.-Mech. Org. 106, 124.

- JANOSSY, G. and GREAVES, M.F. (1971) Lymphocyte Activation. I. Response of T and B Lymphocytes to Phytomitogens. Clin. exp. Immunol. 9, 483.
- KILLMANN, S.-A. (1968) Acute leukemia: The kinetics of leukemic blast cells in man. Ser. Haematol. I/38, 103.
- KOEPPEN, K.-M., BOLL, I. und DOMEYER, C. (1978) Antigenstimulation peripherer Leukozyten von Patienten mit akuten Leukämien. Internat. Krebskongr. Buenos Aires.
- KOEPPEN, K.-M., BOLL, I., DOMEYER, C. (1977) Die Transformationsfähigkeit akuter, nicht lymphoblastischer Leukämien und ihre prognostische Bedeutung. ISH, Istanbul. Klin. Wschr. 56, 779. (1978)
- KURRLE, E. und HOELZER, D. (1976) Wachstumscharakteristik von Zellen des peripheren Blutes bei Patienten mit akuten Leukämien in Suspensionskulturen und Diffusionskammern. - Erkrankungen der Myelopoese - Hrsg. Alois Stacher und Paul Höcker. Urban & Schwarzenberg. München-Berlin-Wien, 26.
- LEIBTSEDER, F. (1957) Karyometrie und Zytometrie. Handbuch der gesamten Haematologie. Hrsg. L. Heilmeyer und A. Hittmair, Bd. I, Teil 1, 179. Urban & Schwarzenberg, München-Berlin-Wien.
- LÖFFLER, H. (1969) Cytochemische Klassifizierung der akuten Leukosen. Hrsg. Alois Stacher. Chemo- und Immuntherapie der Leukosen und malignen Lymphome. Bohmann, Wien.
- LÖFFLER, H. (1975) Einige Kriterien und praktische Hinweise zur Klassifizierung unreifzelliger (akuter) Leukämien. Inn. Med. 2, 219. Heft 4.
- MOORE, M.A.S., WILLIAMS, N., METCALF, D., GARSON, O.M. & HURDLE, A.D.F. (1972 a) Control of Human Leukemic Cell Proliferation and Differentiation in Agar Culture. In Cell Differentiation. Ed. R. Harris and D. Viza. Copenhagen: Munksgaard, 108.
- NEHRING, M.E. (1978) Auswertung von unspezifischer T-Zellstimulation von akuten Leukämien und infektiösen Mononukleosen durch Differentialzählung. Dissertation, Berlin.

- PAULISCH, R. (1975) Zytologische Klassifikation der Leukämien: Verbesserte Prognose. Diagnostik 8, 496.
- RIND, H. (1958) Atlas der Phasenkontrasthämatologie. Akademie-Verlag Berlin.
- RIND, H. (1963) Angewandte Phasenkontrasthämatologie. Habilitationsschrift, Bd. I + II, Gießen.
- SOMMER, K.-M. (1976) Phasenkontrastkinematographie von Knochenmark-Stammzellen beim Menschen. Dissertation, Berlin.
- SPITZER, G., SCHWARZ, M.A., DICKE, K.A., TRUJILLO, J.M. & McCREDIE, K.B. (1976) Significance of PHA Induced Clonogenic Cells in Chronic Myeloid Leukemia and Early Acute Myeloid Leukemia. Blood Cells 2, 149.
- STOBBE, H. (1970) Hämatologischer Atlas, 3. Aufl. Berlin. Akademie-Verlag.

G. Anhang

ANHANGI. Messdaten vergrößerter leukämischer Blasten nach Zusatz von
PHA-P + PWM zum Zeitpunkt t_0 und t_x

Nr. Pat. Diagn.	Kernfläche μm^2	Zellfläche μm^2	Kern μm	Zell μm	KP-R	KP-R μm	KX
1 P. AML	t_0 52,63	140,76	0,37	8,19	13,39	0,61	1/2
	t_x 84,46	234,60	0,36	10,37	17,28	0,60	1
2 R. AML	t_0 46,51	106,08	0,44	7,70	11,62	0,66	1/2
	t_x 70,99	152,18	0,47	9,51	13,92	0,68	1
3 R. AML	t_0 17,50	55,63	0,31	4,72	8,42	0,56	1/16
	t_x 21,25	43,75	0,49	5,20	7,46	0,70	1/8
4 R. AML	t_0 35,63	94,38	0,38	6,74	10,96	0,61	1/4
	t_x 48,13	113,75	0,42	7,82	12,03	0,65	1/2
5 J. AML	t_0 26,24	46,66	0,56	5,78	7,71	0,75	1/8
	t_x 53,22	75,10	0,71	8,23	9,78	0,84	1/2
6 J. AML	t_0 18,95	43,01	0,44	4,91	7,40	0,66	1/16
	t_x 51,03	90,40	0,56	8,06	10,73	0,75	1/2
7 R. AML	t_0 66,56	123,52	0,54	9,21	12,54	0,73	1/2
	t_x 69,44	125,76	0,55	9,40	12,65	0,74	1
8 R. AML	t_0 20,33	57,35	0,35	5,09	8,55	0,60	1/8
	t_x 34,12	59,00	0,57	6,59	8,73	0,75	1/4
9 B. AML	t_0 35,94	77,32	0,46	6,76	9,92	0,68	1/4
	t_x 44,29	94,38	0,47	7,51	10,96	0,69	1/2

I. Fortsetzung:

Nr.	Pat.	Diagn.	Kernfläche μm^2	Zellfläche μm^2	KP-R	KernØ μm	ZellØ μm	KPØ-R	KK
10	B.	AML	t_0 26,49	42,10	0,63	5,81	7,32	0,79	1/8
			t_x 34,48	47,91	0,72	6,63	7,81	0,85	1/4
11	B.	AML	t_0 34,40	69,60	0,49	6,62	9,41	0,70	1/4
			t_x 42,83	61,71	0,69	7,38	8,86	0,83	1/2
12	B.	AML	t_0 36,66	74,05	0,49	6,83	9,70	0,70	1/4
			t_x 47,19	84,21	0,56	7,75	10,35	0,75	1/2
13	B.	AML	t_0 33,75	58,44	0,58	6,55	8,63	0,76	1/4
			t_x 49,00	60,98	0,80	7,89	8,81	0,89	1/2
14	M.	AMOL	t_0 69,71	121,24	0,51	8,86	12,42	0,71	1/2
			t_x 80,59	151,01	0,53	10,13	13,37	0,73	1
15	S.	OML	t_0 45,29	85,27	0,53	7,59	10,42	0,73	1/2
			t_x 73,44	130,56	0,56	9,67	12,89	0,75	1
16	S.	OML	t_0 58,75	159,38	0,37	8,65	14,25	0,61	1/2
			t_x 80,00	179,38	0,45	10,09	15,11	0,67	1
Mittel			t_0 39,08	84,70	0,46	6,87	10,16	0,67	1/4
			σ $\pm$ 16,29	$\pm$ 36,33	$\pm$ 0,09	$\pm$ 1,40	$\pm$ 2,17	$\pm$ 0,06	
Mittel			t_x 55,27	106,54	0,55	8,26	11,29	0,74	1/2
			σ $\pm$ 18,92	$\pm$ 53,15	$\pm$ 0,12	$\pm$ 1,48	$\pm$ 2,77	$\pm$ 0,07	

II. Messdaten vergrößerter, unstimulierter leukämischer Blasten
zum Zeitpunkt t_0 und t_x

Nr.	Pat.	Diagn.	Kernfläche μm^2	Zellfläche μm^2	KP-R	Kern $\emptyset$ μm	Zell $\emptyset$ μm	KP $\emptyset$ -R	KX
1	L.	AML	t_0 19,60	30,86	0,64	4,99	6,27	0,80	1/16
			t_x 21,78	37,40	0,58	5,60	6,90	0,76	1/8
2	B.	AML	t_0 32,23	57,53	0,56	6,41	8,56	0,75	1/4
			t_x 42,02	62,42	0,67	7,31	8,91	0,82	1/2
3	L.	ANoL	t_0 25,92	41,70	0,62	5,74	7,29	0,79	1/8
			t_x 29,12	43,52	0,67	6,09	7,44	0,82	1/4
4	S.	sm.L	t_0 32,67	99,83	0,33	6,45	11,27	0,57	1/4
			t_x 47,19	103,09	0,46	7,75	11,46	0,68	1/2
5	P.	sm.L	t_0 46,92	99,14	0,47	7,73	11,24	0,69	1/2
			t_x 88,13	299,06	0,29	10,59	19,51	0,54	1
6	H.	OML	t_0 54,72	102,72	0,53	8,35	11,44	0,73	1/2
			t_x 68,80	207,04	0,33	9,36	16,24	0,58	1
7	H.	OML	t_0 55,63	100,63	0,55	8,42	11,32	0,74	1/2
			t_x 75,73	153,75	0,49	9,81	13,99	0,70	1
Mittel			t_0 38,24	76,05	0,52	6,87	9,62	0,72	1/4
			σ $\pm$ 14,23	$\pm$ 31,56	$\pm$ 0,10	$\pm$ 1,32	$\pm$ 2,21	$\pm$ 0,07	
Mittel			t_x 53,25	129,46	0,49	8,07	12,06	0,70	1/2
			σ $\pm$ 24,83	$\pm$ 96,97	$\pm$ 0,15	$\pm$ 1,90	$\pm$ 4,74	$\pm$ 0,01	

III. Messdaten vergrößerter Lymphozyten von Gesunden nach
Zusatz von PHA-P + PWM zum Zeitpunkt t_0 und t_x

Nr.	Pat.	Kernfläche μm^2	Zellfläche μm^2	KP-R	KernØ μm	ZellØ μm	KPØ-R	KK
1	B.	t_0 22,72	48,00	0,47	5,38	7,82	0,69	1/8
		t_x 29,44	54,72	0,54	6,12	8,35	0,73	1/4
2	M.	t_0 26,24	53,95	0,49	5,78	8,29	0,70	1/8
		t_x 43,01	110,81	0,39	7,40	11,88	0,62	1/2
3	M.	t_0 15,61	27,59	0,57	4,46	5,93	0,75	1/16
		t_x 21,78	34,12	0,64	5,27	6,59	0,80	1/8
4	A.	t_0 17,06	50,82	0,34	4,66	8,04	0,58	1/16
		t_x 32,31	59,17	0,55	6,41	8,68	0,74	1/4
5	S.	t_0 20,69	37,39	0,55	5,13	6,90	0,74	1/8
		t_x 30,13	61,71	0,49	6,19	8,86	0,70	1/4
6	M.	t_0 33,53	92,58	0,36	6,53	10,86	0,60	1/4
		t_x 53,95	96,96	0,56	8,29	11,11	0,75	1/2
7	P.	t_0 41,02	83,13	0,49	7,23	10,29	0,70	1/4
		t_x 69,33	148,83	0,46	9,40	13,77	0,68	1
8	P.	t_0 40,82	73,63	0,55	7,21	9,68	0,74	1/4
		t_x 68,53	129,03	0,53	9,34	12,82	0,73	1

III. Fortsetzung:

Nr.	Pat.	Kernfläche μm^2	Zellfläche μm^2	KP-R	Kern $\emptyset$ μm	Zell $\emptyset$ μm	KP $\emptyset$ -R	KK
9	S. t_o	28,31	75,50	0,37	6,00	9,80	0,61	1/8
	t_x	37,03	145,56	0,25	6,87	13,61	0,50	1/4
10	W. t_o	60,80	122,24	0,50	8,80	12,47	0,70	1/2
	t_x	69,76	113,60	0,61	9,42	12,03	0,78	1
11	L. t_o	15,97	32,31	0,49	4,51	6,41	0,70	1/16
	t_x	25,77	47,19	0,55	5,73	7,75	0,74	1/8
12	G. t_o	36,45	78,00	0,47	6,81	9,96	0,68	1/4
	t_x	45,20	87,48	0,52	7,59	10,55	0,72	1/2
13	F. t_o	39,37	68,53	0,57	7,08	9,34	0,76	1/4
	t_x	47,38	71,44	0,66	7,77	9,54	0,81	1/2
Mittel $\bar{x}$								
	t_o	30,66	64,89	0,47	6,12	8,90	0,68	1/4
	σ	$\pm 13,07$	$\pm 26,73$	$\pm 0,07$	$\pm 1,30$	$\pm 1,88$	$\pm 0,05$	
Mittel $\bar{x}$								
	t_x	44,12	89,27	0,51	7,36	10,42	0,71	1/2
	σ	$\pm 16,91$	$\pm 38,08$	$\pm 0,10$	$\pm 1,42$	$\pm 2,32$	$\pm 0,08$	

H. Verwendete Abkürzungen

AML	Akute Myeloische Leukämie
CML	Chronische Myeloische Leukämie
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AProL	Akute Promyelozyten Leukämie
AMoL	Akute Monozytäre Leukämie
Smould. L.	Smouldering Leukemia
PHA-P	Phythämagglutinin - Protein
PWM	Pokeweed Mitogen
KK	Kernklasse
KP-R	Kern/Plasma-Relation
KPØ-Relation	Kern/Plasma/Durchmesser-Relation
KernØ	Kerndurchmesser
ZellØ	Zelldurchmesser
t _o	Beobachtungsbeginn
t _x	Beobachtungsende

Frau Prof. Dr. I.Boll danke ich für die Überlassung des Themas, die Beratung und zahlreichen Anregungen, sowie für die stete Bereitschaft, über anstehende Probleme zu diskutieren.

Bei Cornelia Domeyer und Hartmut Voigt bedanke ich mich für die technische Assistenz.

Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft und die Kommission für Graduiertenförderung der Freien Universität Berlin unterstützt.

Lebenslauf

Christine Spehr, geboren am 4.4.1951 in Berlin

Eltern: Lucie Spehr, geb. Dröse und Hieronymus Spehr

Schulische Ausbildung:

1. IV. Grundschule Berlin Tempelhof 1957 - 1963

2. Askanische Oberschule (Gymnasium) 1963 - 1970

Besuch der Hochschule: Freie Universität Berlin

Medizinstudium: vom 2.12.1970 - 30.9.1977

Abschluß mit dem Staatsexamen am 24.2.1977

Medizinalassistentenzeit:

1. Innere Medizin / Krankenhaus Am Urban,
Prof. Dr. Freyschmidt vom 1.8.1977 - 30.11.1977

2. Chirurgie / St.Gertrauden Krankenhaus,
Chefarzt Dr. Bittner vom 1.4.1978 - 31.7.1978

Das gesamte Jahr 1978 bis einschließlich Februar 1979
arbeitete ich als Doktorandin im Forschungslabor bei
Frau Prof. Dr. Boll

3. Innere Medizin / Städtisches Krankenhaus Neukölln,
Prof. Dr. Wagner vom 1.3.1979 - 30.6.1979

Approbation als Arzt am 30.6.1979

Vom 1.1.1980 bis zum 31.12.1980 war ich als Assistenzärztin
im Städtischen Krankenhaus Neukölln / I. Innere Abteilung
bei Prof. Dr. Wagner beschäftigt.

Seit dem 1.9.1981 arbeite ich als Assistenzärztin im
Rudolf-Virchow-Krankenhaus / Kinderchirurgie bei
Prof. Dr. Haße

